



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201028433 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098135686

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/00 (2006.01)** **C07K1/18 (2006.01)**
C07K1/36 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/20 美國 61/196,754

(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)
美國

(72)發明人：錫克曼 羅伯特 K HICKMAN, ROBERT K. (US)；可瑞亞 依凡 R CORREIA, IVAN R. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：5 共 126 頁

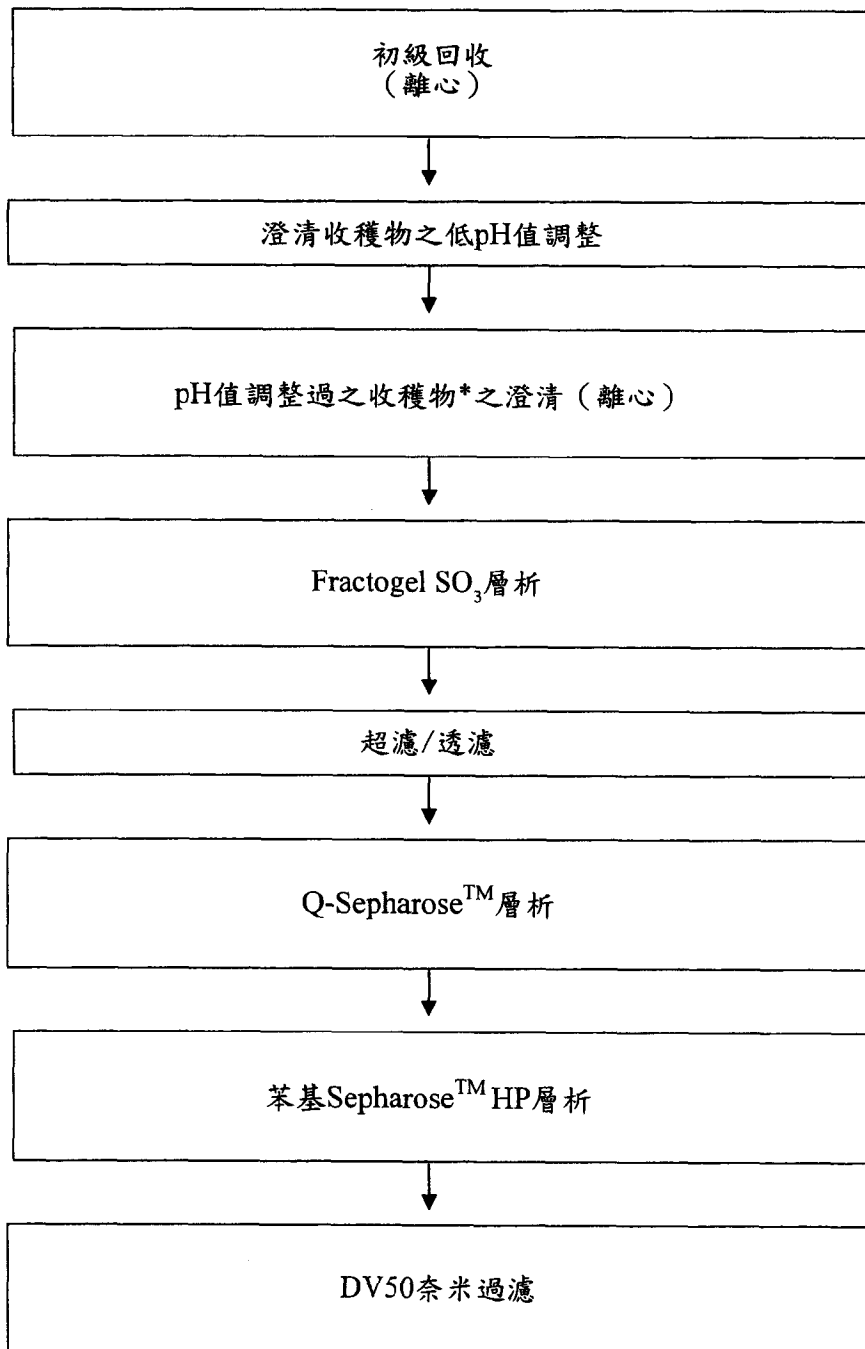
(54)名稱

抗體純化過程中之病毒去活化

VIRAL INACTIVATION DURING PURIFICATION OF ANTIBODIES

(57)摘要

本文中描述自樣品基質分離及純化抗體之方法。本發明之一態樣係關於使抗體純化之各步驟中所產生之樣品之病毒減少/去活化。在特定態樣中，本文中之方法採用酸化步驟，接著一或多個層析步驟。層析步驟可包括一或多個以下層析程序：離子交換層析、親和性層析及疏水相互作用層析。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201028433 A1

(43)公開日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：098135686

(22)申請日：中華民國 98 (2009) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : *C07K16/00 (2006.01)* *C07K1/18 (2006.01)*
C07K1/36 (2006.01)

(30)優先權：2008/10/20 美國 61/196,754

(71)申請人：亞培公司 (美國) ABBOTT LABORATORIES (US)
美國

(72)發明人：錫克曼 羅伯特 K HICKMAN, ROBERT K. (US)；可瑞亞 依凡 R CORREIA, IVAN R. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：31 項 圖式數：5 共 126 頁

(54)名稱

抗體純化過程中之病毒去活化

VIRAL INACTIVATION DURING PURIFICATION OF ANTIBODIES

(57)摘要

本文中描述自樣品基質分離及純化抗體之方法。本發明之一態樣係關於使抗體純化之各步驟中所產生之樣品之病毒減少/去活化。在特定態樣中，本文中之方法採用酸化步驟，接著一或多個層析步驟。層析步驟可包括一或多個以下層析程序：離子交換層析、親和性層析及疏水相互作用層析。

六、發明說明：

本申請案主張2008年10月20日申請之美國臨時申請案第61/196,754號之權利，該申請案之全文以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

藉由醱酵培養物產生之醫藥級單株抗體的純化過程通常涉及四個基本步驟。此等步驟包括(1)收穫/澄清-自醱酵培養物中分離宿主細胞；(2)捕獲-將抗體與澄清收穫物中之大部分組份分離；(3)精細純化-移除殘餘宿主細胞污染物及聚集物；及(4)調配-將抗體安置於適當載劑中以獲得最大穩定性及最長存放期。

然而，此等步驟通常不一定解決可能之病毒污染。目前對於產生及純化適於臨床使用之所關注抗體的方法存在需要，其包括使污染性有害病毒減少及/或去活化。本發明著手解決此需要。

【發明內容】

本發明係關於自樣品基質分離及純化抗體之方法。本發明之一態樣係關於使在抗體純化之各個步驟中產生之樣品病毒去活化。在特定態樣中，本文中之方法採用酸去活化步驟，繼之以一或多個層析步驟。層析步驟可包括一或多個以下層析程序：離子交換層析、親和性層析及疏水性相互作用層析。另外，本發明係關於包含一或多種藉由本文中描述之方法純化之抗體的醫藥組合物。

本發明之一個實施例係關於一種自樣品基質中純化抗體

或其抗原結合部分以使得所得抗體組合物實質上不含宿主細胞蛋白質(「HCP」)的方法。在一態樣中，樣品基質(或簡稱「樣品」)包含細胞株收穫物，其中細胞株用於產生本發明之特異性抗體。在特定態樣中，自用於產生抗IL-12抗體之細胞株製備樣品基質；在另一態樣中，自用於產生抗TNF α 抗體之細胞株製備樣品基質；且在另一態樣中，自用於產生抗IL-18抗體之細胞株製備樣品基質。

本發明之一方法涉及使包含所關注之假定抗體或其抗原結合部分的樣品基質調整pH值。在一態樣中，將pH值調整至酸性pH值。適合pH值之實例為介於約3與約5之間，較佳為約3.5。進行此初級回收以部分地減少pH值敏感性病毒或使其去活化。除減少病毒及/或使其去活化之外，酸性條件亦有助於移除細胞及細胞碎屑，由此形成初級回收樣品。在適合時段之後，可調整pH值接近較中性或鹼性pH值且在某些實施例中，使樣品經歷一或多個層析步驟，包括(但不限於)親和性層析、離子交換層析及疏水性相互作用層析。

在一實施例中，親和性層析步驟包含使初級回收樣品經歷包含適合親和性層析支撐物之管柱。該等層析支撐物之非限制性實例包括(但不限於)蛋白質A樹脂、蛋白質G樹脂、包含藉以形成所關注之抗體之抗原的親和性支撐物及包含Fc結合蛋白之親和性支撐物。蛋白質A樹脂適用於親和性純化及分離抗體(IgG)。在一態樣中，在裝載樣品之前將蛋白質A管柱以適合緩衝液平衡。適合緩衝液之實例

為 Tris/NaCl 緩衝液，pH 值為約 7.2。在此平衡之後，可將樣品裝載至管柱上。在裝載管柱之後，可使用例如平衡緩衝液洗滌管柱一或多次。在溶離管柱之前可使用其他洗滌，包括採用不同緩衝液之洗滌。可隨後使用適當溶離緩衝液溶離蛋白質 A 管柱。適合溶離緩衝液之實例為乙酸/NaCl 緩衝液，pH 值為約 3.5。可使用熟習此項技術者所熟知之技術監測溶離液。舉例而言，可追蹤 OD₂₈₀ 下之吸光度。可隨後製備所關注之溶離份以進一步處理。

在某些實施例中，使樣品經歷一或多個其他層析程序。在一態樣中，初級回收樣品經歷離子交換層析。在此實施例中，離子交換步驟可為陽離子或陰離子交換層析或兩者之組合。此步驟可包括多個離子交換步驟，諸如陽離子交換步驟，繼之以陰離子交換步驟，或反之亦然。在一態樣中，離子交換步驟涉及兩步式離子交換過程。在特定態樣中，在第一陽離子交換步驟之後進行第二陰離子交換步驟。適合陽離子交換管柱為固定相包含陰離子基團之管柱。該管柱之實例為 Fractogel SO₃⁻管柱。此離子交換捕獲層析步驟有助於自初級回收樣品分離所關注之抗體。適合陰離子交換管柱為固定相包含陽離子基團之管柱。該管柱之實例為 Q Sepharose™ 管柱。一或多個離子交換步驟進一步藉由減少雜質(諸如宿主細胞蛋白質及 DNA 及(若適用)親和性基質蛋白質)來分離抗體。此陰離子交換程序為流通模式之層析(與陽離子交換程序相反)，其中抗體不與陰離子交換樹脂(或固相)相互作用或與其結合。然而，許多雜

質與陰離子交換樹脂相互作用且與其結合。

在另一實施例中，離子交換樣品經歷進一步層析。在一態樣中，此步驟涉及使用疏水性相互作用層析(「HIC」)。適合管柱為固定相包含疏水性基團之管柱。該管柱之實例為苯基Sepharose™管柱。抗體有可能已在分離/純化過程中形成聚集物。此疏水性層析步驟有助於消除此等聚集物。其亦輔助移除雜質。該程序使用促進抗體(或其聚集物)與疏水性管柱相互作用的高鹽緩衝液。使用較低濃度之鹽溶離管柱。

在一實施例中，在初級回收之後執行第一及第二離子交換步驟。在此實施例中，離子交換樣品經歷中間過濾步驟。在一態樣中，此過濾步驟包含捕獲超濾/透濾(「UF/DF」)。此過濾步驟有助於例如濃縮抗體及其抗原結合部分。

在另一實施例中，使用病毒移除過濾器(諸如 Ultipor DV50™過濾器)過濾HIC溶離液。此程序將病毒顆粒與苯基溶離液分離以將病毒(若存在)之量減少至安全水準。此實施例中可使用熟習此項技術者所熟知之過濾器。

可使用熟習此項技術者所熟知之方法(例如西方墨點分析)分析所得樣品產物中單株抗體之純度。

在另一實施例中，本發明係關於一或多種包含經分離單株抗體或其抗原結合部分及可接受之載劑的醫藥組合物。在另一態樣中，組合物進一步包含一或多種醫藥劑。

【實施方式】

本發明係關於自樣品基質分離及純化抗體之方法。本發明之一態樣係關於使在抗體純化之各個步驟中產生之樣品病毒去活化。在特定態樣中，本文中之方法採用酸去活化步驟，繼之以一或多個層析步驟。層析步驟可包括一或多個以下層析程序：離子交換層析、親和性層析及疏水性相互作用層析。另外，本發明係關於包含一或多種藉由本文中所描述之方法純化之抗體的醫藥組合物。

為了清晰起見而非為了限制，此實施方式分成以下子部分：

1. 定義；
2. 抗體生成；
3. 抗體產生；
4. 抗體純化；
5. 檢定樣品純度之方法；
6. 其他修飾；
7. 醫藥組合物；及
8. 抗體用途。

1. 定義

為更容易地理解本發明，首先定義某些術語。

術語「抗體」包括免疫球蛋白分子，其包含由雙硫鍵互連之四個多肽鏈，兩個重(H)鏈及兩個輕(L)鏈。各重鏈包含重鏈可變區(在本文中縮寫為HCVR或VH)及重鏈恆定區(CH)。重鏈恆定區包含三個域，CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(在本文中縮寫為LCVR或VL)及輕鏈恆

定區。輕鏈恆定區包含一個域，CL。VH及VL區可另外再分成散置有較保守區(稱為構架區(FR))的高變區，稱為互補決定區(CDR)。各VH及VL由三個CDR及四個FR構成，其自胺基末端至羧基末端按以下順序配置：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

術語抗體之「抗原結合部分」(或「抗體部分」)包括保持特異性結合於抗原(例如hIL-12、hTNF α 或hIL-18)之能力的抗體片段。已顯示抗體之抗原結合功能可由全長抗體之片段進行。在術語抗體之「抗原結合部分」內涵蓋之結合片段之實例包括(i) Fab片段，包含VL、VH、CL及CH1域之單價片段；(ii) F(ab')₂片段，包含在鉸鏈區由雙硫橋連接之兩個Fab片段的二價片段；(iii) Fd片段，其包含VH及CH1域；(iv) Fv片段，其包含抗體單臂之VL及VH域，(v) dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546，其全部教示以引用的方式併入本文中)，其包含VH域；及(vi)經分離之互補決定區(CDR)。此外，雖然Fv片段之兩個域VL及VH由獨立基因編碼，但是可使用重組方法藉由合成連接子使其接合，該合成連接子使其能夠製成單一蛋白質鏈，其中VL及VH區配對以形成單價分子(稱為單鏈Fv(scFv)；例如參見Bird等人(1988) Science 242:423-426；及Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883，其全部教示以引用的方式併入本文中)。該等單鏈抗體亦意欲涵蓋於術語抗體之「抗原結合部分」內。亦涵蓋其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體。雙功能抗體為

VH及VL域表現於單一多肽鏈上之二價、雙特異性抗體，但其使用的連接子太短而不容許同一鏈上之兩個域之間配對，從而促使該等域與另一鏈之互補域配對且形成兩個抗原結合部位(例如參見Holliger, P.等人(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J.等人(1994) *Structure* 2:1121-1123，其全部教示以引用的方式併入本文中)。另外，抗體或其抗原結合部分可為藉由抗體或抗體部分與一或多個其他蛋白質或肽之共價或非共價締合所形成之較大免疫黏附分子之一部分。該等免疫黏附分子之實例包括使用抗生蛋白鏈菌素核心區製成之四聚物scFv分子(Kipriyanov, S. M.等人(1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101，其全部教示以引用的方式併入本文中)及使用半胱胺酸殘基、標記肽及C-末端聚組胺酸標籤製成之二價生物素標記之scFv分子(Kipriyanov, S. M.等人(1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058，其全部教示以引用的方式併入本文中)。可使用習知技術自全抗體製備抗體部分，諸如Fab及F(ab')₂片段，該等習知技術諸如分別對全抗體進行番木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化。另外，可使用如本文中描述之標準重組DNA技術獲得抗體、抗體部分及免疫黏附分子。在一態樣中，抗原結合部分為完全域或完全域之對。

如本文中所用之短語「人類介白素12」(在本文中縮寫為hIL-12或IL-12)包括主要由巨噬細胞及樹突狀細胞分泌之人類細胞激素。該術語包括包含藉由雙硫橋連接在一起

之 35 kD 次單位 (p35) 及 40 kD 次單位 (p40) 之雜二聚蛋白質。雜二聚蛋白質稱為「p70 次單位」。另外在例如 Kobayashi 等人 (1989) *J. Exp Med.* 170:827-845 ; Seder 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:10188-10192 ; Ling 等人 (1995) *J. Exp Med.* 154:116-127 ; Podlaski 等人 (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 294:230-237 中描述人類 IL-12 之結構，該等參考文獻之全部教示以引用的方式併入本文中。編碼 IL-12 之核酸可以 GenBank 寄存編號 NM_000882 獲得且多肽序列可以 GenBank 寄存編號 NP_000873.2 獲得。術語人類 IL-12 意欲包括可由標準重組表現方法製備之重組人類 IL-12 (rh IL-12)。

如本文中所用之短語「人類介白素 18」(在本文中縮寫為 hIL-18 或 IL-18) 包括最初以生物學上非活性 193 胺基酸前驅物蛋白質以及藉由例如 (但不限於) 前驅物蛋白質之裂解 (例如藉由卡斯蛋白酶-1 或卡斯蛋白酶-4) 所產生之 156 胺基酸成熟蛋白質形式合成之人類細胞激素，其展現包括協同刺激 T 細胞增生、增強 NK 細胞細胞毒性、誘導 T 細胞及 NK 細胞產生 IFN- γ 及增強 T 輔助類型 1 (Th1) 分化的生物學活性。編碼 IL-18 之核酸可以 GenBank 寄存編號 NM_001562 獲得且多肽序列可以 GenBank 寄存編號 NP_001553 獲得。術語人類 IL-18 意欲包括可由標準重組表現方法製備之重組人類 IL-18 (rh IL-18)。

短語「人類腫瘤壞死因子- α 」(在本文中縮寫為 hTNF α 或 TNF α) 為主要由單核細胞/巨噬細胞分泌之多功能促發炎性

細胞激素，其對脂質代謝、凝血、胰島素抵抗及內皮功能有影響。TNF α 為17 kD蛋白質次單位之可溶性均三聚物。亦存在膜結合26 kD前驅物形式之TNF α 。其可見於組織中之滑膜細胞及巨噬細胞中。除單核細胞或巨噬細胞以外之細胞亦產生TNF α 。舉例而言，人類非單核細胞性腫瘤細胞株產生TNF α 以及CD4+及CD8+末梢血液T淋巴細胞且一些經培養之T及B細胞株產生TNF α 。編碼TNF α 之核酸可以GenBank寄存編號X02910獲得且多肽序列可以GenBank寄存編號CAA26669獲得。術語人類TNF α 意欲包括可由標準重組表現方法製備之重組人類TNF α (rh TNF α)。

術語「Kabat編號」、「Kabat定義」及「Kabat標記」在本文中可互換使用。在此項技術中公認之此等術語係指與抗體或其抗原結合部分之重鏈及輕鏈可變區中之其他胺基酸殘基相比，可變性更大(亦即高變)的胺基酸殘基之編號系統(Kabat等人(1971) Ann. NY Acad, Sci. 190:382-391及Kabat, E. A. 等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication第91-3242號, 其全部教示以引用的方式併入本文中)。對於重鏈可變區而言，高變區在CDR1之胺基酸位置31至35，CDR2之胺基酸位置50至65，及CDR3之胺基酸位置95至102之範圍內。對於輕鏈可變區而言，高變區在CDR1之胺基酸位置24至34，CDR2之胺基酸位置50至56，及CDR3之胺基酸位置89至97之範圍內。

術語「人類抗體」包括可變區及恆定區與如Kabat等人描述之人類生殖系免疫球蛋白序列對應的抗體(參見Kabat等人(1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication第91-3242號)。本發明之人類抗體可例如在CDR且尤其CDR3中包括並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之胺基酸殘基(例如在活體外藉由隨機突變誘發或部位特異性突變誘發或在活體內由體細胞突變所引入之突變)。可使用「選擇性突變誘發方法」引入突變。人類抗體可具有至少一個位置經胺基酸殘基置換, 例如經並非由人類生殖系免疫球蛋白序列編碼之增強活性之胺基酸殘基置換。人類抗體可具有至多二十個位置經不為人類生殖系免疫球蛋白序列之一部分的胺基酸殘基置換。在其他實施例中, 至多十個、至多五個、至多三個或至多兩個位置經置換。在一實施例中, 此等置換在CDR區內。然而, 如本文中所用之術語「人類抗體」不欲包括源自另一哺乳動物物種(諸如小鼠)生殖系之CDR序列已移植於人類構架序列上之抗體。

短語「選擇性突變誘發方法」包括藉由選擇至少一個適合選擇性突變誘發位置、超突變及/或接觸位置且使其CDR胺基酸個別地突變來改良抗體活性之方法。「選擇性突變」人類抗體為在使用選擇性突變誘發方法選擇之位置處包含突變之抗體。在另一態樣中, 選擇性突變誘發方法意欲提供一種在抗體之重鏈可變區之CDR1、CDR2或

CDR3(在下文中分別為H1、H2及H3)或輕鏈可變區之CDR1、CDR2或CDR3(以下分別稱為L1、L2及L3)中使所選個別胺基酸殘基優先突變的方法。胺基酸殘基可選自選擇性突變誘發位置、接觸位置或超突變位置。根據在輕鏈或重鏈可變區中之位置選擇個別胺基酸。應瞭解超突變位置亦可為接觸位置。在一態樣中，選擇性突變誘發方法為「標靶方法」。措辭「標靶方法」意欲包括以標靶方法(例如「組式標靶方法」或「CDR式標靶方法」)使抗體之重鏈可變區之CDR1、CDR2或CDR3或輕鏈可變區之CDR1、CDR2或CDR3中之所選個別胺基酸殘基突變的方法。在「組式標靶方法」中，特定組中之個別胺基酸殘基經標靶以進行選擇性突變，包括組I(包括L3及H3)、II(包括H2及L1)及III(包括L2及H1)，各組係以標靶優先順序來列出。在「CDR式標靶方法」中，特定CDR中之個別胺基酸殘基經標靶以進行選擇性突變，且標靶之優先順序如下：H3、L3、H2、L1、H1及L2。所選胺基酸殘基經突變成例如至少兩種其他胺基酸殘基，且突變對於抗體活性之影響係經測定。活性係以抗體之結合特異性/親和性及/或抗體之中和效能之變化來量測。應瞭解選擇性突變誘發方法可用於最佳化源自任何來源之任何抗體，包括噬菌體呈現、具有人類IgG生殖系基因之轉殖基因動物、自人類B細胞分離之人類抗體。選擇性突變誘發方法可用於不能使用噬菌體呈現技術進一步最佳化的抗體。應瞭解源自任何來源之抗體(包括噬菌體呈現、具有人類IgG生殖系基因之轉

殖基因動物、自人類B細胞分離之人類抗體)可在選擇性突變誘發方法之前或之後經歷回復突變。

短語「重組人類抗體」包括藉由重組方法製備、表現、形成或分離之人類抗體，諸如使用轉染至宿主細胞中之重組表現載體表現之抗體，自重組、組合人類抗體庫分離之抗體，自針對人類免疫球蛋白基因進行轉殖基因之動物(例如小鼠)分離之抗體(例如參見Taylor, L. D.等人(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295，其全部教示以引用的方式併入本文中)或藉由涉及將人類免疫球蛋白基因序列拼接至其他DNA序列之任何其他方法製備、表現、形成或分離之抗體。該等重組人類抗體具有源自人類生殖系免疫球蛋白序列之可變區及恆定區(參見Kabat, E. A.等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。然而，在某些實施例中，該等重組人類抗體經歷活體外突變誘發(或當使用針對人類Ig序列進行轉殖基因之動物時，經歷活體內體細胞突變誘發)且因此重組抗體之VH及VL區之胺基酸序列為雖然源自人類生殖系VH及VL序列且與其有關，但是可能並不活體內天然存在於人類抗體生殖系集合中的序列。然而，在某些實施例中，該等重組抗體為選擇性突變誘發方法或回復突變或兩者之結果。

「經分離抗體」包括實質上不含其他具有不同抗原特異性之抗體的抗體(例如特異性結合hIL-12之經分離抗體實質

上不含特異性結合除hIL-12以外之抗原的抗體)。特異性結合hIL-12之經分離抗體可結合來自其他物種之IL-12分子。另外，經分離抗體可實質上不含其他細胞物質及/或化學物。在本發明之情形中可純化之適合抗IL-12抗體揭示於美國專利第6,914,128號(其全部以引用的方式併入本文中)中，包括(但不限於)在彼專利中識別為J695且隨後識別為ABT-874之抗IL-12抗體。在本發明之情形中可純化及分離之適合抗IL-18抗體揭示於USSN 09/780,035及10/988,360中，包括隨後識別為ABT-325之抗體。適合抗TNF α 抗體為阿達木單抗(Abbott Laboratories)。

「中和抗體」(或「中和hIL-12活性之抗體」)包括與hIL-12結合會導致抑制hIL-12之生物活性的抗體。hIL-12生物活性之此抑制可藉由量測hIL-12生物活性之一或多種指標來評定，諸如植物凝集素胚血球增生檢定(PHA)中人類植物凝集素胚血球增生之抑制或人類IL-12受體結合檢定中受體結合之抑制。可藉由此項技術中已知之若干標準活體外或活體內檢定中之一或多者評定hIL-12生物活性之此等指標。

「中和抗體」(或「中和hIL-18活性之抗體」)包括與hIL-18結合會導致抑制hIL-18之生物活性的抗體。hIL-18生物活性之此抑制可藉由量測hIL-18生物活性之一或多種指標來評定，諸如誘導T細胞或NK細胞產生IFN γ 或人類IL-18受體結合檢定中IL-18受體結合之抑制。可藉由此項技術中已知之若干標準活體外或活體內檢定中之一或多者

評定hIL-18生物活性之此等指標。

術語「活性」包括以下活性，諸如抗體對於抗原之結合特異性/親和性，例如結合於IL-12抗原之抗hIL-12抗體；及/或抗體之中和效能，例如結合於hIL-12之抗hIL-12抗體抑制hIL-12之生物活性，例如抑制PHA胚血球增生或抑制人類IL-12受體結合檢定中之受體結合。術語「活性」亦包括以下活性，諸如抗IL-18抗體對於其抗原之結合特異性/親和性，例如結合於IL-18抗原之抗hIL-18抗體；及/或抗體之中和效能，例如結合於hIL-18之抗hIL-18抗體抑制hIL-18之生物活性。術語「活性」亦包括以下活性，諸如抗TNF α 抗體對於其抗原之結合特異性/親和性，例如結合於TNF α 抗原之抗TNF α 抗體；及/或抗體之中和效能，例如結合於hTNF α 之抗TNF α 抗體抑制hTNF α 之生物活性。

短語「表面電漿共振」包括容許藉由例如使用BIAcore系統 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.)偵測生物感應器基質內蛋白質濃度變化來分析即時生物特異性相互作用的光學現象。關於其他描述，參見Jonsson, U.等人(1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26；Jonsson, U.等人(1991) Biotechniques 11:620-627；Johnsson, B.等人(1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131；及Johnnson, B.等人(1991) Anal. Biochem. 198:268-277，其全部教示併入本文中。

如本文中所用之術語「Koff」意指抗體自抗體/抗原複合物中解離的解離速率常數。

如本文中所用之術語「Kd」意指特定抗體-抗原相互作用之解離常數。

短語「核酸分子」包括DNA分子及RNA分子。核酸分子可為單股或雙股，但在一態樣中為雙股DNA。

如本文中所用之短語「經分離核酸分子」係指編碼抗體或抗體部分(例如VH、VL、CDR3)(例如結合hIL-12、hTNF α 或hIL-18之彼等者)之核酸，且包括編碼抗體或抗體部分之核苷酸序列不含編碼結合除hIL-12、hTNF α 或hIL-18以外之抗原之抗體或抗體部分的其他核苷酸序列的核酸分子，該等其他序列可在人類染色體組DNA中天然側接該核酸。因此，例如編碼抗IL-12h、抗TNF α 或抗hIL-18抗體之VH區之本發明經分離核酸不含編碼結合除例如IL-12、hTNF α 或hIL-18以外之抗原之其他VH區的其他序列。短語「經分離核酸分子」亦意欲包括編碼二價、雙特异性抗體之序列，諸如VH及VL區不含有除雙功能抗體之序列以外之其他序列的雙功能抗體。

短語「重組宿主細胞」(或簡稱「宿主細胞」)包括已引入重組表現載體中之細胞。應瞭解該等術語不僅意指本發明之特定細胞而且意指該細胞之子代。因為可能歸因於突變或環境影響而在後繼世代中出現某些修飾，所以該子代事實上可能不與母細胞相同，但仍包括於如本文中所用之術語「宿主細胞」之範圍內。

如本文中所用之術語「修飾」意指改變抗體或其抗原結合部分中之一或多個胺基酸。可藉由一或多個位置處胺基

酸之添加、取代或缺失來產生變化。可使用已知技術(諸如PCR突變誘發)產生變化。

如本文中所用之術語「約」意指大於或小於參考值之約10-20%的範圍。在某些情況中，熟習此項技術者認識到歸因於參考值之性質，術語「約」可意謂大於或小於10-20%偏離彼值。

如本文中所用之短語「病毒減少/去活化」意指特定樣品中病毒顆粒之數目減少以及特定樣品中病毒顆粒之活性(例如(但不限於)感染性或複製能力)減小(「去活化」)。病毒顆粒之該等數目減少及/或活性減小可為約1%至約99%、較佳約20%至約99%、更佳約30%至約99%、更佳約40%至約99%、甚至更佳約50%至約99%、甚至更佳約60%至約99%、然而更佳約70%至約99%、然而更佳約80%至99%，且然而更佳約90%至約99%。在某些非限制性實施例中，經純化之抗體產物中之病毒(若有)量小於彼病毒之ID₅₀(感染50%目標群體之病毒量)、較佳至少為彼病毒之ID₅₀的1/10、更佳至少為彼病毒之ID₅₀的1/100，且更佳至少為彼病毒之ID₅₀的1/1000。

短語「接觸位置」包括抗體之重鏈可變區或輕鏈可變區之CDR1、CDR2或CDR3中之由以二十六種已知抗體-抗原結構中之一者接觸抗原之胺基酸佔據的胺基酸位置。若CDR胺基酸以抗體-抗原複合物之二十六種已知解開結構中之任一者接觸抗原，則彼胺基酸可視為佔據接觸位置。與非接觸位置相比，接觸位置被接觸抗原之胺基酸佔據之

機率較高。在一態樣中，接觸位置為含有以26種結構中之3者以上(>1.5%)接觸抗原之胺基酸的CDR位置。在另一態樣中，接觸位置為含有以25種結構中之8者以上(>32%)接觸抗原之胺基酸的CDR位置。

2. 抗體生成

如在此部分中使用之術語「抗體」係指完整抗體或其抗原結合片段。

可藉由各種技術生成本發明之抗體，包括以所關注之抗原對動物進行免疫，接著進行習知單株抗體方法，例如Kohler及Milstein (1975) Nature 256: 495之標準體細胞雜交技術。雖然體細胞雜交程序較佳，但是原則上可採用其他產生單株抗體之技術，例如B淋巴細胞之病毒或致癌轉型。

製備融合瘤之一較佳動物系統為鼠類系統。融合瘤產生係極其制定完善之程序。免疫方案及分離經免疫之脾細胞以便進行融合之技術在此項技術中為已知的。融合搭配物(例如鼠類骨髓瘤細胞)及融合程序亦為已知的。

抗體較佳可為人類、嵌合或人類化抗體。可基於如上所述製備之非人類單株抗體之序列製備本發明之嵌合或人類化抗體。可使用標準分子生物學技術自所關注之非人類融合瘤獲得編碼重鏈及輕鏈免疫球蛋白之DNA且將其工程改造以含有非鼠類(例如人類)免疫球蛋白序列。舉例而言，為了形成嵌合抗體，可使用此項技術中已知之方法(例如參見Cabilly等人之美國專利第4,816,567號)將鼠類可變區

與人類恆定區連接。為了形成人類化抗體，可使用此項技術中已知之方法(例如參見Winter之美國專利第5,225,539號及Queen等人之美國專利第5,530,101號、第5,585,089號、第5,693,762號及第6,180,370號)將鼠類CDR區插入人類構架中。

在一非限制性實施例中，本發明之抗體為人類單株抗體。可使用攜有人類免疫系統而非小鼠系統之一部分的轉殖基因或轉染色體小鼠生成針對IL-12、hTNF α 或IL-18之該等人類單株抗體。此等轉殖基因及轉染色體小鼠包括本文中稱為HuMAb Mouse®(Medarex, Inc.)、KM Mouse®(Medarex, Inc.)及XenoMouse®(Amgen)之小鼠。

另外，此項技術中可獲得表現人類免疫球蛋白基因之替代轉染色體動物系統，且其可用於形成本發明之抗體，諸如抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體。舉例而言，可使用攜有人類重鏈轉染色體及人類輕鏈轉染色體之小鼠，稱為「TC小鼠」；該等小鼠描述於Tomizuka等人(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727中。此外，此項技術中已描述攜有人類重鏈及輕鏈轉染色體之牛(例如Kuroiwa等人(2002) Nature Biotechnology 20:889-894及PCT申請案第WO 2002/092812號)且其可用於形成本發明之抗IL-12、抗TNF α 或抗IL18抗體。

可藉由對使用由源自人類淋巴細胞之mRNA製備之人類VL及VH cDNA製備之重組組合抗體庫(例如scFv噬菌體呈現庫)進行篩選來分離本發明之重組人類抗體，包括(但不

限於)抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體或其抗原結合部分，或本文中揭示之抗IL-12相關、抗TNF α 相關或抗IL-18相關之抗體。此項技術中已知製備及篩選該等庫之方法。除生成噬菌體呈現庫之可購得之套組(例如Pharmacia重組噬菌體抗體系統，目錄號27-9400-01；及Stratagene SurfZAP™噬菌體呈現套組，目錄號240612，其全部教示併入本文中)之外，尤其適用於生成及篩選抗體呈現庫之方法及試劑的實例可見於以下文獻中，例如Ladner等人美國專利第5,223,409號；Kang等人PCT公開案第WO 92/18619號；Dower等人PCT公開案第WO 91/17271號；Winter等人PCT公開案第WO 92/20791號；Markland等人PCT公開案第WO 92/15679號；Breitling等人PCT公開案第WO 93/01288號；McCafferty等人PCT公開案第WO 92/01047號；Garrard等人PCT公開案第WO 92/09690號；Fuchs等人(1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay等人(1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85；Huse等人(1989) Science 246:1275-1281；McCafferty等人，Nature (1990) 348:552-554；Griffiths等人(1993) EMBO J 12:725-734；Hawkins等人(1992) J Mol Biol 226:889-896；Clackson等人(1991) Nature 352:624-628；Gram等人(1992) PNAS 89:3576-3580；Garrard等人(1991) Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboom等人(1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137；及Barbas等人(1991) PNAS 88:7978-7982，其全部教示併入本文中。

亦可使用已再組(reconstitute)人類免疫細胞以使得可在免疫後產生人類抗體反應的SCID小鼠來製備本發明之人類單株抗體。該等小鼠描述於例如Wilson等人之美國專利第5,476,996號及第5,698,767號中。

在某些實施例中，本發明之方法包括抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體及抗體部分，抗IL-12相關、抗TNF α 相關或抗IL-18相關之抗體及抗體部分以及與抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體具有相等性質(諸如與hIL-12、hTNF α 或hIL-18高親和力結合以及較低解離動力學及較高中和能力)的人類抗體及抗體部分。在一態樣中，本發明提供藉由經分離之人類抗體或其抗原結合部分所進行之治療，如藉由表面電漿共振所測定，該抗體或其抗原結合部分以約 1×10^{-8} M或 1×10^{-8} M以下之Kd及 1×10^{-3} s⁻¹或 1×10^{-3} s⁻¹以下之Koff速率常數與hIL-12、hTNF α 或hIL-18解離。在特定非限制性實施例中，本發明之經純化之抗IL12抗體在生理條件下競爭性抑制ABT-874與IL12之結合。在特定非限制性實施例中，本發明之經純化之抗IL-18抗體在生理條件下競爭性抑制ABT-325與IL-18之結合。在特定非限制性實施例中，本發明之經純化之抗TNF α 抗體在生理條件下競爭性抑制阿達木單抗與TNF α 之結合。

在本發明之另一實施例中，可改變抗體或其片段，諸如(但不限於)抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體或其片段，其中修飾抗體之恆定區以相對於未修飾之抗體減少至少一種恆定區介導之生物效應功能。為修飾本發明之抗體使得其

展現減少之與Fc受體之結合，可在Fc受體(FcR)相互作用所需的特定區處使抗體之免疫球蛋白恆定區區段進行突變(例如參見Canfield及Morrison (1991) J. Exp. Med. 173: 1483-1491；及Lund等人(1991) J. of Immunol. 147:2657-2662，其全部教示併入本文中)。抗體之FcR結合能力之減少亦可減少依賴於FcR相互作用之其他效應功能，諸如助噬素作用及吞噬作用及抗原依賴性細胞細胞毒性。

3. 抗體產生

為表現本發明之抗體，將編碼部分或全長輕鏈及重鏈之DNAs插入一或多個表現載體中以使得該等基因可操作地與轉錄及轉譯控制序列連接。(參見例如美國專利第6,914,128號，其全部教示以引用的方式併入本文中。)在此情形中，術語「可操作地連接」意欲意謂抗體基因接合至載體以使得載體內之轉錄及轉譯控制序列發揮其調節該抗體基因之轉錄及轉譯之預定功能。選擇表現載體及表現控制序列以與所用表現宿主細胞相容。可將抗體輕鏈基因及抗體重鏈基因插入各別載體中，或更典型地，將兩種基因插入同一表現載體中。藉由標準方法將抗體基因插入表現載體中(例如抗體基因片段上之互補限制部位與載體接合，或若不存在限制部位，則鈍端接合)。在插入抗體或抗體相關之輕鏈或重鏈序列之前，表現載體可能已攜有抗體恆定區序列。舉例而言，一種將抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體或抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體相關之VH及VL序列轉化成全長抗體基因之方法為將其分別插入已編

碼重鏈恆定區及輕鏈恆定區之表現載體中，以使得VH區段可操作地與載體內之CH區段連接且VL區段可操作地與載體內之CL區段連接。另外，或者，重組表現載體可編碼有助於抗體鏈自宿主細胞分泌之信號肽。可將抗體鏈基因選殖至載體中以使得信號肽同框(in-frame)連接至抗體鏈基因之胺基端。信號肽可為免疫球蛋白信號肽或異源信號肽(亦即非免疫球蛋白之信號肽)。

除抗體鏈基因之外，本發明之重組表現載體可攜有一或多個控制抗體鏈基因在宿主細胞中之表現之調節序列。術語「調節序列」意欲包括控制抗體鏈基因之轉錄或轉譯之啟動子、強化子及其他表現控制元件(例如聚腺苷酸化信號)。該等調節序列描述於例如 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)中，其全部教示以引用的方式併入本文中。熟習此項技術者應瞭解表現載體之設計(包括調節序列之選擇)視諸如待轉型之宿主細胞之選擇、所需蛋白質之表現量等等因素而定。用於哺乳動物宿主細胞表現之適合調節序列包括引導哺乳動物細胞中之高蛋白質表現量的病毒元件，諸如源自以下之啟動子及/或強化子：細胞巨大病毒(CMV)(諸如CMV啟動子/強化子)、猿猴病毒40(SV40)(諸如SV40啟動子/強化子)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期啟動子(AdMLP))及多瘤。關於病毒調節元件及其序列之其他描述，例如參見 Stinski之美國專利第5,168,062號、Bell等人之美國專利第4,510,245號及 Schaffner等人之

美國專利第4,968,615號，其全部教示以引用的方式併入本文中。

除抗體鏈基因及調節序列之外，本發明之重組表現載體可攜有一或多個其他序列，諸如調節載體在宿主細胞中之複製的序列(例如複製起點)及/或可選擇標記基因。可選擇標記基因有助於選擇已引入載體之宿主細胞(例如參見全部授予Axel等人之美國專利第4,399,216號、第4,634,665號及第5,179,017號，其全部教示以引用的方式併入本文中)。舉例而言，可選擇標記基因通常將對於藥物(諸如G418、潮黴素(hygromycin)或甲胺喋呤(methotrexate))之抗性賦予已引入載體之宿主細胞。適合可選擇標記基因包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(利用甲胺喋呤選擇/擴增用於dhfr-宿主細胞)及neo基因(用於G418選擇)。

可藉由免疫球蛋白輕鏈及重鏈基因在宿主細胞中之重組表現來製備本發明之抗體或抗體部分。為了重組表現抗體，以一或多個攜有編碼抗體之免疫球蛋白輕鏈及重鏈之DNA片段之重組表現載體轉染宿主細胞以使得輕鏈及重鏈表現於宿主細胞中且分泌至培養宿主細胞之培養基中，可自培養基中回收抗體。使用標準重組DNA方法以獲得抗體重鏈及輕鏈基因，將此等基因併入重組表現載體中且將載體引入宿主細胞中，諸如在以下中所描述之彼等方法：Sambrook, Fritsch及Maniatis (編), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel等人(編) Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Publishing Associates, (1989)及美國專利第4,816,397號及第6,914,128號，其全部教示併入本文中。

為表現輕鏈及重鏈，藉由標準技術將編碼重鏈及輕鏈之表現載體轉染至宿主細胞中。各種形式之術語「轉染」意欲涵蓋通常用於將外源性DNA引入原核或真核宿主細胞中之多種技術，例如電穿孔、磷酸鈣沈澱、DEAE-葡聚糖轉染及其類似技術。雖然在理論上可在原核或真核宿主細胞中表現本發明之抗體，但是抗體適合在真核細胞(諸如哺乳動物宿主細胞)中表現，此歸因於與原核細胞相比，該等真核細胞且尤其哺乳動物細胞更能組裝及分泌正確摺疊且具免疫活性之抗體。已報導抗體基因之原核表現對於產生高產率之活性抗體而言為效率低的(Boss及Wood (1985) Immunology Today 6:12-13，其全部教示以引用的方式併入本文中)。

適合於在本文中之載體中選殖或表現DNA之宿主細胞為如上所述之原核生物、酵母或較高級真核生物細胞。適合於此目的之原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏菌屬(*Escherichia*)(例如大腸桿菌)、腸桿菌屬、歐文氏菌屬(*Erwinia*)、克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、沙門氏菌屬(*Salmonella*)(例如鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌屬(例如黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescans*))及志賀氏菌屬(*Shigella*)以及芽孢桿菌屬(*Bacilli*)(諸如枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及地衣芽

孢桿菌 (*B. licheniformis*)(例如 1989 年 4 月 12 日 公開之 DD 266,710 中 揭 示 之 地 衣 芽 孢 桿 菌 41P))、假單胞菌屬 (*Pseudomonas*)(諸如綠膿假單胞菌 (*P. aeruginosa*))及鏈黴菌屬 (*Streptomyces*)。一種合適的大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌 294(ATCC 31,446)，但諸如大腸桿菌 B、大腸桿菌 X1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌 W3110(ATCC 27,325)之其他菌株亦為適合的。此等實例為說明性而非限制性的。

除原核生物之外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物為編碼多肽之載體之適合選殖或表現宿主。釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)或常見麵包酵母(baker's yeast)為最常用之較低級真核宿主微生物。然而，許多其他種類、物種及菌株通常可利用且適用於本文中，諸如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克魯維酵母 (*Kluyveromyces*)宿主，諸如乳酸克魯維酵母 (*K. lactis*)、脆壁克魯維酵母 (*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞克魯維酵母 (*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、維克拉米克魯維酵母 (*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、沃爾第克魯維酵母 (*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅克魯維酵母 (*K. drosophilarum*)(ATCC 36,906)、耐熱乳酸克魯維酵母 (*K. thermotolerans*)及乳清克魯維酵母 (*K. marxianus*)；耶氏酵母 (*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母 (*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；假絲酵母屬 (*Candida*)；里氏木黴 (*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌 (*Neurospora crassa*)；許旺酵母 (*Schwanniomyces*)(諸如西方許旺酵母 (*Schwanniomyces*

occidentalis))；及絲狀真菌，諸如紅黴菌(*Neurospora*)、青黴菌(*Penicillium*)、彎頸黴菌(*Tolypocladium*)及曲黴菌(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢曲黴菌(*A. nidulans*)及黑曲黴菌(*A. niger*)。

適合於表現糖基化抗體之宿主細胞源自多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已識別許多桿狀病毒株及變異體及來自諸如以下宿主之相應容許昆蟲宿主細胞：草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊子)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊子)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)。用於轉染之各種病毒株公開可獲得，例如加洲苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明，該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及煙草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

適合於表現本發明之重組抗體之哺乳動物宿主細胞包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括如 Urlaub 及 Chasin, (1980) PNAS USA 77:4216-4220 中所描述之 dhfr-CHO 細胞，其與例如如 Kaufman 及 Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 中所描述之 DHFR 可選擇標記一起使用，該等參考文獻之全部教示以引用的方式併入本文中)、NS0 骨髓瘤細胞、COS 細胞及 SP2 細胞。當將編碼抗體基因之重組表現載體引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由培養宿主細胞一段足以容許在宿

主細胞中表現抗體或將抗體分泌至生長宿主細胞之培養基中的時間來產生抗體。適用哺乳動物宿主細胞株之其他實例為經SV40轉型之猴腎CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651); 人類胚腎株(293細胞或經次選殖以便在懸浮培養物中生長之293細胞, Graham等人, J. Gen Virol. 36:59 (1977)); 幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10); 中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 小鼠塞爾托利(sertoli)細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲綠猴腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); 水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75); 人類肝細胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS4細胞; 及人類肝腫瘤株(Hep G2), 其全部教示以引用的方式併入本文中。

宿主細胞經上述用於產生抗體之表現或選殖載體轉型且在習知營養培養基中培養, 若適宜, 該營養培養基經改良以便誘導啟動子、選擇轉型體或擴增編碼所需序列之基因。

用於產生抗體之宿主細胞可在各種培養基中培養。諸如Ham's F10™(Sigma)、Minimal Essential Medium™((MEM),

Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及Dulbecco's Modified Eagle's Medium™((DMEM), Sigma)之可購得之培養基適於培養宿主細胞。另外,在Ham等人,Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes等人,Anal. Biochem. 102:255 (1980)、美國專利第4,767,704號、第4,657,866號、第4,927,762號、第4,560,655號或第5,122,469號、WO 90/03430、WO 87/00195或美國專利第Re. 30,985號中所描述之任何培養基可用作宿主細胞之培養基,其全部教示以引用的方式併入本文中。若需要,任何此等培養基可用以下來補充:激素及/或其他生長因子(諸如胰島素、轉鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如慶大黴素(gentamycin)藥物)、微量元素(定義為通常以微莫耳濃度範圍中之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者已知之適當濃度的任何其他必要補充劑。諸如溫度、pH值及其類似條件之培養條件為先前用於所選宿主細胞表現的條件,且為一般技術者所顯而易見。

宿主細胞亦可用於產生完整抗體之一部分,諸如Fab片段或scFv分子。應瞭解上述程序之變化在本發明之範圍內。舉例而言,在某些實施例中,可能需要以編碼本發明之抗體輕鏈或重鏈(而非同時兩者)之DNA轉染宿主細胞。重組DNA技術亦可用於移除一些或全部不為結合至IL-12、特定為hIL-12所需的編碼輕鏈及重鏈中之一或兩者

的DNA(在抗IL-12抗體之情形中)或不為結合至IL-18、特定為hIL-18所需的DNA(在抗IL-18抗體之情形中)或不為結合至TNF α 、特定為hTNF α 所需的DNA(在抗TNF α 抗體之情形中)。本發明之抗體亦涵蓋由該等截斷DNA分子所表現之分子。另外，可藉由標準化學交聯方法將本發明之抗體與第二抗體交聯來產生雙功能抗體，其中一個重鏈及一個輕鏈為本發明之抗體且另一重鏈及輕鏈對於除IL-12、TNF α 或IL-18(視本發明之抗體特異性而定)以外之抗原具有特異性。

在重組表現本發明之抗體或其抗原結合部分之適合系統中，藉由磷酸鈣介導之轉染將編碼抗體重鏈及抗體輕鏈之重組表現載體引入dhfr-CHO細胞中。在重組表現載體內，抗體重鏈及輕鏈基因各自可操作地與CMV強化子/AdMLP啟動子調節元件連接以驅動基因之高水準轉錄。重組表現載體亦攜有DHFR基因，其容許選擇已利用甲胺喋呤選擇/擴增經載體轉染之CHO細胞。培養所選轉型體宿主細胞以容許表現抗體重鏈及輕鏈且自培養基中回收完整抗體。使用標準分子生物學技術以製備重組表現載體、轉染宿主細胞、選擇轉型體、培養宿主細胞及自培養基回收抗體。

當使用重組技術時，抗體可在細胞內產生，產生於周質間隙中，或直接分泌於培養基中。在一態樣中，若在細胞內產生抗體，則作為第一步驟，可例如藉由離心或超濾移除宿主細胞或溶解之細胞(例如因均化作用所產生)的微粒碎片。當抗體分泌至培養基中時，可首先使用可購得之蛋

白質濃縮過濾器(例如 Amicon™ 或 Millipore Pellicon™ 超濾單元)來濃縮來自該等表現系統之上清液。

在本發明之方法之前，最初自細胞碎片純化抗體之程序視抗體之表現部位而定。一些抗體可直接自細胞分泌至周圍生長培養基中；其他在細胞內產生。對於後者抗體而言，純化過程之第一步驟通常涉及溶解細胞，其可藉由各種方法(包括機械剪切、滲壓衝擊或酶促處理)進行。該破壞將細胞之全部內容物釋放至勻漿中，且另外產生歸因於較小尺寸而難以移除之亞細胞片段。此等通常藉由差速離心或藉由過濾移除。當分泌抗體時，通常首先使用可購得之蛋白質濃縮過濾器(例如 Amicon™ 或 Millipore Pellicon™ 超濾單元)來濃縮來自該等表現系統之上清液。當抗體分泌至培養基中時，亦可例如藉由切向流過濾自細胞培養基中分離重組宿主細胞。另外可使用本發明之抗體純化方法自培養基中回收抗體。

4. 抗體純化

4.1 一般抗體純化

本發明提供一種自包含抗體及至少一種HCP之混合物產生經純化(或「HCP減少」)之抗體製劑的方法。當已使用如上所述之方法及此項技術中之習知方法產生抗體時，本發明之純化方法開始於分離步驟。表1概述純化方案之一個實施例。設想此方案之變化形式，包括(但不限於)省略蛋白質A親和性層析步驟或逆轉離子交換步驟順序的變化形式，且該等變化形式在本發明之範圍內。

表 1 純化步驟及其相關目的

純化步驟	目的
初級回收	澄清樣品基質
親和性層析	捕獲抗體，減少宿主細胞蛋白質及相關雜質
陽離子交換層析	捕獲抗體，減少宿主細胞蛋白質及相關雜質
超濾/透濾	濃縮及緩衝液交換
陰離子交換層析	減少宿主細胞蛋白質及DNA
苯基Sepharose™ HP層析	減少抗體聚集物及宿主細胞蛋白質
病毒過濾	移除較大病毒(若存在)
最終超濾/透濾	濃縮且調配抗體

一旦已獲得澄清溶液或包含抗體之混合物，使用不同純化技術(包括離子交換分離步驟及疏水性相互作用分離步驟)之組合分離抗體與由細胞產生之其他蛋白質(諸如HCP)。分離步驟基於電荷、疏水性程度或尺寸來分離蛋白質之混合物。在本發明之一態樣中，使用層析(包括陽離子、陰離子及疏水性相互作用)進行分離。此等技術中之每一者可利用若干不同層析樹脂，從而使得相對於所涉及之特定蛋白質來準確裁適純化方案。各分離方法之實質為可使得蛋白質以不同速率沿著管柱穿越，達成在其沿著管柱進一步傳遞時增加的物理分離，或選擇性地黏附至分離介質，其隨後藉由不同溶劑差別性溶離。在一些情況下，當雜質特定地黏附於管柱且抗體不黏附，亦即抗體存在於流通中時，將抗體與雜質分離。

如上所述，純化方案之準確裁適依賴於對待純化之蛋白質之考量。在某些實施例中，採用本發明之分離步驟以將抗體與一或多種HCP分離。可使用本文中描述之方法成功地純化之抗體包括(但不限於)人類IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄及IgM抗體。在某些實施例中，本發明之純化策略不包括使用蛋白質A親和性層析，例如純化IgG₃抗體，此歸因於IgG₃抗體與蛋白質A結合效率較低。容許特定裁適純化方案之其他因素包括(但不限於)：存在或不存在Fc區(例如在與Fab片段相比之全長抗體的情形中)，此歸因於蛋白質A與Fc區結合；用於產生所關注之抗體之特定生殖系序列；及抗體之胺基酸組成(例如抗體之一級序列以及分子之總電荷/疏水性)。共有一或多個特徵之抗體可使用經裁適以利用彼特徵之純化策略來純化。

4.2 初級回收

本發明之純化方法之初始步驟涉及將抗體自樣品基質中澄清及初級回收的第一階段。另外，初級回收過程亦可為使可存在於樣品基質中之病毒去活化之時點。舉例而言，可在純化之初級回收階段過程中使用各種病毒去活化方法中之任一或多者，包括熱去活化(巴氏滅菌(pasteurization))、pH值去活化、溶劑/清潔劑處理、UV及 γ -射線照射及添加某些化學去活化劑，諸如 β -丙內酯或例如如美國專利第4,534,972號中之銅啡啉，該專利之全部教示以引用的方式併入本文中。在本發明之某些實施例中，在初級回收階段

過程中使樣品基質經歷pH值病毒去活化。

pH值病毒去活化之方法包括(但不限於)在較低pH值下培育混合物一段時間，隨後使pH值中和及藉由過濾移除微粒。在某些實施例中，在約2與5之間的pH值下、較佳在約3與4之間的pH值下，且更佳在約3.5之pH值下培育混合物。可藉由包括(但不限於)檸檬酸、乙酸、辛酸或其他適合酸之任何適合酸降低樣品混合物之pH值。pH值水準之選擇主要視抗體產物之穩定性概況及緩衝液組份而定。已知在低pH值病毒去活化過程中，標靶抗體品質受pH值及低pH值培育之持續時間的影響。在某些實施例中，低pH值培育之持續時間為0.5小時至2小時，較佳0.5小時至1.5小時，且更佳持續時間為1小時。除可在高濃度下減少去活化之蛋白質濃度之外，病毒去活化視此等相同參數而定。因此，可選擇蛋白質濃度、pH值及去活化持續時間之適當參數以達成所需水準之病毒去活化。

在某些實施例中，可經由使用適合過濾器達成病毒去活化。適合過濾器之非限制性實例為來自Pall Corporation之Ultipor DV50™過濾器。雖然本發明之某些實施例在初級回收階段過程中採用該過濾，但是在其他實施例中在純化方法之其他階段(包括如純化之倒數第二步驟或最後步驟)下採用該過濾。在某些實施例中，替代過濾器用於病毒去活化，諸如(但不限於)Viresolve™過濾器(Millipore, Billerica, Mass.)；Zeta Plus VR™過濾器(CUNO; Meriden, Conn.)；及Planova™過濾器(Asahi Kasei Pharma, Planova

Division, Buffalo Grove, Ill.)。

在採用病毒去活化之彼等實施例中，若需要，可調整樣品混合物以便進行進一步純化步驟。舉例而言，在低pH值病毒去活化之後，通常將樣品混合物之pH值調整至較中性pH值，例如約4.5至約8.5，較佳為約4.9，隨後繼續進行純化過程。另外，可以注射用水(WFI)沖洗混合物以獲得所需電導率。

在某些實施例中，初級回收包括一或多個離心步驟以進一步澄清樣品基質，從而幫助純化抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體。樣品離心可在例如(但不限於)7,000 $\times$ g至約12,750 $\times$ g下運作。在大規模純化之情形中，可藉由經設定以在所得上清液中達成例如(但不限於)150 NTU之混濁度水準的流動速率來線上進行該離心。可隨後收集該上清液以便進行進一步純化。

在某些實施例中，初級回收包括使用一或多個深度過濾步驟以進一步澄清樣品基質，從而幫助純化抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體。深度過濾器含有具有分級密度(graded density)之過濾介質。該分級密度容許較大顆粒在過濾器之表面附近被捕獲，而較小顆粒滲透過濾器表面處之較大開口區域，僅在較接近於過濾器中心的較小開口中被捕獲。在某些實施例中，深度過濾步驟可為除脂深度過濾步驟。雖然某些實施例僅在初級回收階段過程中採用深度過濾步驟，但是其他實施例在一或多個其他純化階段過程中採用深度過濾器，包括除脂深度過濾器。可在本發明

之情形中使用之深度過濾器的非限制性實例包括 Cuno™ 30/60ZA型深度過濾器(3M Corp.)及 0.45/0.2 µm Sartopore™ 雙層過濾濾筒。

4.3 親和性層析

在某些實施例中，初級回收樣品經歷親和性層析以進一步純化所關注之抗體以脫除HCP。在某些實施例中，層析物質能夠選擇性或特異性結合至所關注之抗體。該層析物質之非限制性實例包括：蛋白質A、蛋白質G、包含由所關注之抗體結合之抗原之層析物質及包含Fc結合蛋白之層析物質。在特定實施例中，親和性層析步驟涉及使初級回收樣品經歷包含適合蛋白質A樹脂之管柱。蛋白質A樹脂適用於親和性純化及分離多種抗體同型，尤其IgG₁、IgG₂及IgG₄。蛋白質A為主要經由Fc區結合至哺乳動物IgG之細菌細胞壁蛋白。蛋白質A在其天然狀態中具有五個IgG結合域以及未知功能之其他域。

存在蛋白質A樹脂之若干商業來源。一種適合樹脂為來自GE Healthcare之MabSelect™。以MabSelect™充填之適合管柱之非限制性實例為約1.0 cm直徑×約21.6 cm長管柱(約17 mL床體積)。此尺寸管柱可用於小規模純化且可與用於規模放大之其他管柱相比。舉例而言，床體積約為6.6 L之20 cm×21 cm管柱可用於更大規模純化。與管柱無關，可使用諸如MabSelect™之適合樹脂充填管柱。

在某些實施例中，為了使純化適合於所關注之特定抗體，識別蛋白質A樹脂之動態結合能力(DBC)為有利的。

例如(但不限於)可藉由單一流動速率裝載或雙重流裝載策略來測定MabSelect™管柱之DBC。可在整個裝載週期中，以約300公分/小時之速度評定單一流動速率裝載。可藉由在約300公分/小時之線速度下將管柱裝載至約35 mg蛋白質/mL樹脂，隨後將線速度降低一半以留出較長滯留時間用於後期裝載來判定雙重流動速率裝載策略。

在某些實施例中，在裝載樣品之前可將蛋白質A管柱以適合緩衝液平衡。適合緩衝液之非限制性實例為Tris/NaCl緩衝液，pH值為約7.2。適合平衡條件之非限制性實例為25 mM Tris，100 mM NaCl，pH值為約7.2。在此平衡之後，可將樣品裝載至管柱上。在裝載管柱之後，可使用例如平衡緩衝液洗滌管柱一或多次。在溶離管柱之前可採用其他洗滌，包括採用不同緩衝液之洗滌。舉例而言，可使用一或多個管柱體積之20 mM檸檬酸/檸檬酸鈉，0.5 M NaCl(pH值為約6.0)洗滌管柱。此洗滌之後可視情況進行一或多次使用平衡緩衝液之洗滌。可隨後使用適當溶離緩衝液溶離蛋白質A管柱。適合溶離緩衝液之非限制性實例為乙酸/NaCl緩衝液，pH值為約3.5。適合條件為例如0.1 M乙酸，pH值為約3.5。可使用熟習此項技術者所熟知之技術監測溶離液。舉例而言，可追蹤OD₂₈₀下之吸光度。可收集自約0.5 AU之初始偏差起始，至溶離峰之後緣處約0.5 AU之讀數下的管柱溶離液。可隨後製備所關注之溶離份以進一步處理。舉例而言，可使用pH值為約10之Tris(例如1.0 M)將所收集到之樣品滴定至約5.0之pH值。視情況

可將此經滴定之樣品過濾且進一步處理。

4.4 離子交換層析

在某些實施例中，本發明提供自包含抗體及至少一種HCP之混合物藉由使該混合物經歷至少一個離子交換分離步驟以使得獲得包含抗體之溶離液來產生HCP減少之抗體的方法。離子交換分離包括藉以根據相應離子電荷之差異來分離兩種物質的任何方法，且可採用陽離子交換物質或陰離子交換物質。

相對於陰離子交換物質來使用陽離子交換物質係基於蛋白質之總電荷。因此，在使用陽離子交換步驟之前採用陰離子交換步驟，或在使用陰離子交換步驟之前採用陽離子交換步驟係在本發明之範圍內。此外，僅採用陽離子交換步驟、僅採用陰離子交換步驟或採用兩者之任何連續組合係在本發明之範圍內。

在進行分離時，可藉由使用各種技術中之任一者(例如使用分批純化技術或層析技術)使初始抗體混合物與離子交換物質接觸。

舉例而言，在分批純化之情形中，在所需起始緩衝液中製備離子交換物質，或相對於所需起始緩衝液來平衡離子交換物質。在製備或平衡後，獲得離子交換物質之漿液。使抗體溶液與漿液接觸以吸附待分離之抗體至離子交換物質。例如藉由容許漿液沈澱且移除上清液來使包含不結合至離子交換物質之HCP之溶液與漿液分離。漿液可經歷一或多個洗滌步驟。若需要，漿液可與較高電導率之溶液接

觸以使已結合至離子交換物質之HCP解除吸附。為了溶離所結合之多肽，可提高緩衝液之鹽濃度。

離子交換層析亦可用作離子交換分離技術。離子交換層析基於分子之總電荷之間的差異分離分子。為純化抗體，抗體必須具有與附接至離子交換物質(例如樹脂)之官能基之彼電荷相反的電荷，以便結合。舉例而言，通常在pH值低於其pI值之緩衝液中具有總正電荷的抗體可較好地結合至含有帶負電荷之官能基的陽離子交換物質。

在離子交換層析時，溶質表面上帶電荷之斑片由附接至層析基質之相反電荷所吸引，其限制條件為周圍緩衝液之離子強度較低。通常藉由增加緩衝液之離子強度(亦即電導率)以與溶質競爭離子交換基質之帶電荷部位來達成溶離。改變pH值，由此轉變溶質之電荷為溶離溶質之另一方法。電導率或pH值之變化可為逐漸的(梯度溶離)或逐步的(階梯溶離)。

陰離子或陽離子取代基可附接至基質以便形成用於層析之陰離子或陽離子支撐物。陰離子交換取代基之非限制性實例包括二乙胺基乙基(DEAE)、四級胺基乙基(QAE)及四級胺(Q)基。陽離子取代基包括羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、磷酸根(P)及磺酸根(S)。可自 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, U.K.獲得纖維素離子交換樹脂，諸如 DE23™、DE32™、DE52™、CM-23™、CM-32™及CM-52™。亦已知基於SEPHADEX®及Iocross連接之離子交換劑。舉例而言，DEAE-SEPHADEX®、QAE-SEPHADEX®、CM-

SEPHADEX® 及 SP-SEPHADEX® 及 DEAE-SEPHADEX® 、 Q-SEPHADEX® 、 CM-SEPHADEX® 及 S-SEPHADEX® 及 SEPHAROSE® 快速流動皆可自 Pharmacia AB 獲得。另外， DEAE 及 CM 衍生之乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物(諸如 TOYOPEARL™ DEAE-650S 或 M 及 TOYOPEARL™ CM-650S 或 M)可自 Toso Haas Co., Philadelphia, Pa 獲得。

將包含抗體及雜質(例如 HCP)之混合物裝載至離子交換管柱(諸如陽離子交換管柱)上。視所用管柱而定，例如(但不限於)以約 80 g 蛋白質/L 樹脂之裝載物來裝載混合物。適合陽離子交換管柱之實例為床體積約為 116 L 之 80 cm 直徑 × 23 cm 長管柱。可隨後以洗滌緩衝液(平衡緩衝液)洗滌裝載至此陽離子管柱上之混合物。隨後自管柱溶離抗體，且獲得第一溶離液。

此離子交換步驟有助於捕獲所關注之抗體，同時減少諸如 HCP 之雜質。在某些態樣中，離子交換管柱為陽離子交換管柱。例如(但不限於)適合於該陽離子交換管柱之樹脂為 CM HyperDF 樹脂。此等樹脂可自諸如 Pall Corporation 之商業來源獲得。可在室溫下或大約在室溫下執行此陽離子交換程序。

4.5 超濾/透濾

本發明之某些實施例採用超濾及/或透濾步驟以進一步純化及濃縮抗體樣品。超濾詳細描述於 Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman 及 A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1996) 及

Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)中。較佳過濾方法為如名為「Pharmaceutical Process Filtration Catalogue」之Millipore目錄第177-202頁(Bedford, Mass., 1995/96)中所述之切向流過濾。超濾通常視為意謂使用細孔尺寸小於0.1 μm 之過濾器的過濾。藉由採用具有該較小細孔尺寸之過濾器，可經由使樣品緩衝液經由過濾器滲透而減小樣品體積，同時抗體保留於過濾器一側(retain behind)。

透濾為使用超濾器以移除及交換鹽、糖及非水溶劑、與所結合之物質分離、移除低分子量物質且/或導致離子及/或pH值環境急劇變化的方法。以近似等於超濾速率之速率將溶劑添加至所超濾之溶液來最有效地移除微溶質。此舉以恆定體積自溶液洗滌微物質，從而有效地純化所保留之抗體。在本發明之某些實施例中，採用透濾步驟以交換與本發明相關所使用之各種緩衝液(隨後視情況進一步層析或進行其他純化步驟)以及自抗體製劑移除雜質。

4.6 疏水性相互作用層析

本發明亦提供自包含抗體及至少一種HCP之混合物產生HCP減少之抗體製劑的方法，其另外包含疏水性相互作用分離步驟。舉例而言，自離子交換管柱獲得之第一溶離液可經歷疏水性相互作用物質以使得獲得HCP含量減少之第二溶離液。通常執行疏水性相互作用層析步驟(諸如本文中揭示之彼等步驟)以移除蛋白質聚集物(諸如抗體聚集物)及過程相關之雜質。

在進行分離時，例如使用分批純化技術或使用管柱使樣品混合物與HIC物質接觸。在HIC純化之前，可能需要例如藉由將混合物傳遞通過前管柱來移除任何離液劑或極具疏水性的物質。

舉例而言，在分批純化之情形中，在所需平衡緩衝液中製備HIC物質，或相對於所需平衡緩衝液來平衡HIC物質。獲得HIC物質之漿液。使抗體溶液與漿液接觸以將待分離之抗體吸附至HIC物質上。例如藉由容許漿液沈澱且移除上清液來使包含不結合至HIC物質之HCP之溶液與漿液分離。漿液可經歷一或多個洗滌步驟。若需要，漿液可與較低電導率之溶液接觸以使已結合至HIC物質之抗體解除吸附。為溶離所結合之抗體，可降低鹽濃度。

儘管離子交換層析依賴於抗體之電荷以將其分離，但疏水性相互作用層析利用的是抗體之疏水性質。抗體上之疏水性基團與管柱上之疏水性基團相互作用。蛋白質疏水性愈大，其與管柱之相互作用愈強。因此，HIC步驟移除源自宿主細胞之雜質(例如DNA及其他高分子量及低分子量產物相關物質)。

疏水性相互作用在較高離子強度下最強，因此宜在鹽沈澱或離子交換程序之後進行此形式之分離。較高鹽濃度有利於抗體吸附至HIC管柱，但視抗體及所選特定HIC配位體之性質而定，實際濃度可在較寬範圍內變化。可視各種離子是否促進疏水性相互作用(鹽析效應)或干擾水結構(離液效應)及導致疏水性相互作用弱化而定，將各種離子以

所謂疏溶劑系列進行排列。按照鹽析效應增加將陽離子分等級，如 Ba^{++} 、 Ca^{++} 、 Mg^{++} 、 Li^{+} 、 Cs^{+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Rb^{+} 、 NH_4^{+} ，同時按照離液效應增加將陰離子分等級，如 PO_4^{---} 、 SO_4^{--} 、 $\text{CH}_3\text{CO}_3^{-}$ 、 Cl^{-} 、 Br^{-} 、 NO_3^{-} 、 ClO_4^{-} 、 I^{-} 、 SCN^{-} 。

一般而言， Na 、 K 或 NH_4 硫酸鹽在HIC中有效地促進配位體-蛋白質相互作用。可調配如由以下關係所給出而影響相互作用強度的鹽： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{NaCl} > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{NaBr} > \text{NaSCN}$ 。一般而言，約0.75與約2 M之間的硫酸銨或約1與4 M之間的 NaCl 之鹽濃度為適用的。

HIC管柱通常包含偶合疏水性配位體(例如烷基或芳基)之基質(例如交聯瓊脂糖(agarose)或合成共聚物物質)。適合HIC管柱包含經苯基取代之瓊脂糖樹脂(例如苯基Sephacrose™管柱)。許多HIC管柱為可購得的。實例包括(但不限於)具有較低或較高取代之苯基Sephacrose™ 6快速流動管柱(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；苯基Sephacrose™高效能管柱(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；辛基Sephacrose™高效能管柱(Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Sweden)；Fractogel™ EMD丙基或Fractogel™ EMD苯基管柱(E. Merck, Germany)；Macro-Prep™甲基支撐物或Macro-Prep™第三丁基支撐物(Bio-Rad, California)；WP HI-丙基(C3)™管柱(J. T. Baker, New Jersey)；及Toyopearl™乙醚、苯基或丁基管柱(TosoHaas, PA)。

4.7 例示性純化策略

在某些實施例中，可藉由依序採用pH值減小、離心及過濾步驟以自生產生物反應器收穫物移除細胞及細胞碎片(包括HCP)來進行初級回收。例如(但不限於)可使用約3.5之酸性pH值使包含抗體、培養基及細胞之培養物經歷pH值介導之病毒去活化歷時約1小時。可使用已知酸製劑(諸如檸檬酸，例如3 M檸檬酸)促進pH值減小。暴露於酸性pH值可減少(若非完全消除)pH值敏感性病毒污染物且使一些培養基/細胞污染物沈澱。在此病毒減少/去活化步驟之後，使用鹼(諸如氫氧化鈉，例如3 M氫氧化鈉)將pH值調整至約4.9或5.0歷時約20至約40分鐘。可在約20°C下進行此調整。在某些實施例中，隨後在約7000×g至約11,000×g下使pH值調整過之培養物離心。在某些實施例中，隨後將所得樣品上清液傳遞通過包含多個深度過濾器之過濾器系列。在某些實施例中，過濾器系列包含約十二個16吋Cuno™ 30/60ZA型深度過濾器(3M Corp.)及裝備有三個30吋0.45/0.2 µm Sartopore™ 2濾筒之約三個圓形過濾器外殼(Sartorius)。澄清上清液收集於容器(諸如預滅菌之收穫容器)中且保持在約8°C下。隨後在以下概述之捕獲層析步驟之前，將此溫度調整至約20°C。應注意熟習此項技術者可改變以上敘述之條件且仍在本發明之範圍內。

在某些實施例中，在初級回收之後使用蛋白質A樹脂進行親和性層析。存在蛋白質A樹脂之若干商業來源。一種適合樹脂為來自GE Healthcare之MabSelect™。以MabSelect™

充填之適合管柱之實例為約1.0 cm直徑×約21.6 cm長管柱(約17 mL床體積)。此尺寸管柱可用於實驗室規模。此可與用於規模放大之其他管柱相比。舉例而言，床體積約為6.6 L之20 cm×21 cm管柱可用於規模放大。與管柱無關，可使用諸如MabSelect™之適合樹脂充填管柱。

在其他實施例中，進一步使用陽離子交換管柱純化澄清上清液。在某些實施例中，用於陽離子交換管柱中之平衡緩衝液為pH值約5.0之緩衝液。適合緩衝液之實例為約210 mM乙酸鈉(pH 5.0)。在平衡之後，以自上述初級回收步驟製備之樣品裝載管柱。以陽離子交換樹脂(諸如來自GE Healthcare之CM Sepharose™快速流動樹脂)充填管柱。隨後使用平衡緩衝液洗滌管柱。接著使管柱經歷使用與平衡或洗滌緩衝液相比具有更大離子強度之緩衝液的溶離步驟。舉例而言，適合溶離緩衝液可為約790 mM乙酸鈉(pH 5.0)。溶離抗體且可使用設定於OD_{280nm}下之UV分光光度計監測。在特定實例中，可自3 OD_{280nm}向上側至8 OD_{280nm}向下側收集溶離物。應瞭解熟習此項技術者可改變條件且仍在本發明之範圍內。

在某些實施例中，作為替代地使用陰離子交換管柱進一步純化自初級回收獲得之澄清上清液。此步驟之適合管柱之非限制性實例為床體積約為85 L之60 cm直徑×23 cm長管柱。以陰離子交換樹脂(諸如來自GE Healthcare之Q Sepharose™快速流動樹脂)充填管柱。可使用約7管柱體積之適當緩衝液(諸如Tris/氯化鈉)來平衡管柱。適合條件

之實例為25 mM Tris，50 mM氯化鈉(pH 8.0)。熟習此項技術者可改變條件但仍在本發明之範圍內。以自以上概述之初級回收步驟收集之樣品裝載管柱。在另一態樣中，由陽離子交換過程中收集到之溶離液裝載管柱。在裝載管柱之後，以平衡緩衝液(例如Tris/氯化鈉緩衝液)洗滌管柱。可使用UV分光光度計於OD_{280nm}下監測包含抗體之流通。此陰離子交換步驟可減少過程相關之雜質，諸如核酸(如DNA)及宿主細胞蛋白質。由於所關注之抗體實質上既不與管柱之固相(例如Q Sepharose™)相互作用亦不與其結合，而許多雜質與管柱之固相相互作用且與其結合，因此實現分離。可在約12°C下進行陰離子交換。

在某些實施例中，視首先採用何種離子交換步驟而定，接著使用例如16吋Cuno™除脂過濾器過濾陽離子交換或陰離子交換溶離液。在使用除脂過濾器之此過濾之後可使用例如30吋0.45/0.2 µm Sartopore™雙層濾筒。可使用離子交換溶離緩衝液來沖洗保留於過濾器中且預備超濾/透濾之殘餘體積。

為了實現超濾/透濾步驟，在適合緩衝液(例如20 mM磷酸鈉(pH 7.0))中製備過濾介質。可添加諸如氯化鈉之鹽以增加離子強度，例如100 mM氯化鈉。此超濾/透濾步驟用來濃縮抗IL-12、抗TNFα或抗IL-18抗體，移除乙酸鈉且調整pH值。商業過濾器可用來實行此步驟。舉例而言，Millipore製造出30 kD分子量截止(MWCO)纖維素超濾膜卡匣。可在室溫下或大約在室溫下進行此過濾程序。

在某些實施例中，使來自以上捕獲過濾步驟之樣品經歷第二離子交換分離步驟。較佳，此第二離子交換分離涉及基於第一離子交換分離之相反電荷的分離。舉例而言，若在初級回收之後採用陰離子交換步驟，則第二離子交換層析步驟可為陽離子交換步驟。相反地，若在初級回收步驟之後為陽離子交換步驟，則彼步驟之後為陰離子交換步驟。在某些實施例中，第一離子交換溶離液可直接經歷第二離子交換層析步驟，其中第一離子交換溶離液調整至適當緩衝條件。適合陰離子及陽離子分離物質及條件如上所述。

在本發明之某些實施例中，使用疏水性相互作用分離步驟進一步處理含有抗體之樣品。該步驟之適合管柱之非限制性實例為床體積為約 75 L 之 80 cm 直徑×15 cm 長的管柱，其以用於 HIC 之適當樹脂（諸如（但不限於）來自 Amersham Biosciences, Upsala, Sweden 之苯基 HP Sepharose™）充填。可以相等體積之約 1.7 M 硫酸銨，50 mM 磷酸鈉（pH 值 7.0）稀釋自先前陰離子交換層析步驟獲得之包含所關注之抗體之流通製劑。此隨後可經歷使用 0.45/0.2 μm Sartopore™ 2 雙層過濾器或其等效物之過濾。在某些實施例中，疏水性層析程序涉及兩個或兩個以上循環。

在某些實施例中，首先使用適合緩衝液來平衡 HIC 管柱。適合緩衝液之非限制性實例為 0.85 M 硫酸銨，50 mM 磷酸鈉（pH 7.0）。熟習此項技術者可藉由轉變緩衝劑之濃度且/或藉由用等效緩衝液取代來改變平衡緩衝液且仍在

本發明之範圍內。在某些實施例中，隨後以陰離子交換流通樣品裝載管柱且以適當緩衝系統(諸如硫酸銨/磷酸鈉)洗滌多次，例如三次。適合緩衝系統之實例包括1.1 M硫酸銨，50 mM磷酸鈉緩衝液(pH值為約7.0)。管柱可視情況經歷進一步洗滌循環。舉例而言，第二洗滌循環可包括使用適當緩衝系統進行多次(例如一至七次)管柱洗滌。適合緩衝系統之非限制性實例包括0.85 M硫酸銨，50 mM磷酸鈉(pH 7.0)。在一態樣中，經裝載之管柱可使用適當緩衝系統進行第三洗滌。可使用緩衝系統(諸如1.1 M硫酸銨，50 mM磷酸鈉(pH值為約7.0))洗滌管柱多次(例如一至三次)。同樣，熟習此項技術者可改變緩衝條件且仍在本發明之範圍內。

可使用適當溶離緩衝液溶離管柱。該溶離緩衝液之適合實例為0.5 M硫酸銨，15 mM磷酸鈉(pH值為約7.0)。可使用習知分光光度計自3 OD_{280 nm}向上側至3 OD_{280 nm}處之峰向下側偵測及收集所關注之抗體。

在本發明之某些態樣中，來自疏水性層析步驟之溶離液經歷過濾以便移除病毒顆粒(包括完整病毒)(若存在)。適合過濾器之非限制性實例為來自Pall Corporation之Ultipor DV50™過濾器。可在此過濾步驟中使用其他病毒過濾器，且其為熟習此項技術者熟知的。在約34磅/平方吋(psig)下，將HIC溶離液傳遞通過約0.1 μm之預濕過濾器及2×30吋Ultipor DV50™過濾器系列。在某些實施例中，在過濾過程之後，使用例如HIC溶離緩衝液洗滌過濾器以便移除

任何保留在過濾器外殼中之抗體。可在約12℃下將濾液儲存於預滅菌之容器中。

在某些實施例中，又將來自以上之濾液經歷超濾/透濾。若從業者之目標為將抗體用於例如醫藥調配物中，則此步驟為重要的。若採用，則此過程可有助於濃縮抗體、移除先前所用之緩衝鹽且將其用特定調配緩衝液置換。在某些實施例中，用多個體積(例如兩個體積)之調配緩衝液連續透濾。適合調配緩衝液之非限制性實例為5 mM甲硫胺酸、2%甘露糖醇、0.5%蔗糖(pH 5.9)緩衝液(無吐溫(Tween))。在完成此透析體積交換後，濃縮抗體。一旦獲得預定濃度之抗體，則從業者可計算應添加以達到約0.005%(v/v)之最終吐溫濃度的10%吐溫之量。

本發明之某些實施例包括其他純化步驟。可在離子交換層析方法之前、期間或之後進行之其他純化程序的實例包括乙醇沈澱、等電聚焦、逆相HPLC、二氧化矽層析、肝素 Sepharose™ 層析、其他陰離子交換層析及/或其他陽離子交換層析、聚焦層析(chromatofocusing)、SDS-PAGE、硫酸銨沈澱、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析及親和性層析(例如使用蛋白質G、抗體、特定受質、配位體或抗原作為捕獲試劑)。

5. 檢定樣品純度之方法

5.1 檢定宿主細胞蛋白質

本發明亦提供測定經分離/經純化抗體組合物中之宿主細胞蛋白質(HCP)濃度之殘餘水準的方法。如上所述，需

要自最終標靶物質產物(例如抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體)中排除HCP。例示性HCP包括源自抗體產生來源的蛋白質。不能識別及充分地移除標靶抗體中之HCP可能會導致減小的功效及/或不利的個體反應。

如本文中所用，術語「HCP ELISA」係指用於檢定中之第二抗體對於自用於產生抗體(例如抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體)之細胞(例如CHO細胞)產生之HCP具有特異性的ELISA。可根據熟習此項技術者已知之習知方法產生第二抗體。舉例而言，可使用藉由假產生及純化運作所獲得之HCP產生第二抗體，亦即使用用於產生所關注之抗體之相同細胞株，但細胞株不以抗體DNA轉染。在例示性實施例中，使用與表現於所選細胞表現系統(亦即用於產生標靶抗體之細胞表現系統)中之HCP類似之HCP產生第二抗體。

通常，HCP ELISA包含將包含HCP之液體樣品夾在兩層抗體(亦即第一抗體與第二抗體)之間。培育樣品，樣品中之HCP在此期間由例如(但不限於)親和性純化之山羊抗CHO(Cygnus)之第一抗體捕獲。添加對於自用於產生抗體之細胞產生之HCP具有特異性之經標記第二抗體或抗體摻合物(例如生物素標記之抗CHO HCP)，且其與樣品內之HCP結合。在某些實施例中，第一及第二抗體為多株抗體。在某些態樣中，第一及第二抗體為針對HCP形成之多株抗體之摻合物，例如(但不限於)生物素標記之山羊抗宿主細胞蛋白質混合物599/626/748。使用基於第二抗體之標

記之適當測試來測定樣品中所含之HCP量。

HCP ELISA可用於測定抗體組合物(諸如使用如上所述之方法獲得之溶離液或流通)中之HCP含量。本發明亦提供包含抗體之組合物，其中如由HCP酶聯免疫吸附檢定(「ELISA」)測定，組合物具有不可偵測之HCP含量。

5.2 檢定親和性層析物質

在某些實施例中，本發明亦提供測定經分離/經純化抗體組合物中之親和性層析物質之殘餘含量的方法。在某些情形中，該物質在純化過程中浸出至抗體組合物中。在某些實施例中，採用識別經分離/純化抗體組合物中之蛋白質A之濃度的檢定。如本文中所用，術語「蛋白質A ELISA」係指用於檢定中之第二抗體對於用於純化所關注之抗體(例如抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體)之蛋白質A具有特異性的ELISA。可根據熟習此項技術者已知之習知方法產生第二抗體。舉例而言，在抗體生成及產生之習知方法的情形中，可使用天然產生或重組蛋白質A產生第二抗體。

通常，蛋白質A ELISA包含將包含蛋白質A(或可能含有蛋白質A)之液體樣品夾在兩層抗蛋白質A抗體(亦即第一抗蛋白質A抗體及第二抗蛋白質A抗體)之間。樣品暴露於第一層抗蛋白質A抗體，例如(但不限於)多株抗體或多株抗體之摻合物，且培育足以使樣品中之蛋白質A由第一抗體捕獲的時間。隨後添加經標記之對於蛋白質A具有特異性之第二抗體，例如(但不限於)多株抗體或多株抗體之摻合

物，且其與樣品內之經捕獲蛋白質A結合。適用於本發明之情形中之抗蛋白質A抗體之其他非限制性實例包括雞抗蛋白質A及生物素標記之抗蛋白質A抗體。使用基於第二抗體之標記之適當測試來測定樣品中所含之蛋白質A之量。可採用類似檢定來識別替代親和性層析物質之濃度。

蛋白質A ELISA可用於測定抗體組合物(諸如使用如上所述之方法獲得之溶離液或流通)中之蛋白質A之含量。本發明亦提供包含抗體之組合物，其中如由蛋白質A酶聯免疫吸附檢定(「ELISA」)測定，組合物具有不可偵測之蛋白質A含量。

6. 其他修飾

本發明之抗體可經修飾。在一些實施例中，抗體或其抗原結合片段經化學修飾以提供所需效應。舉例而言，可藉由此項技術中已知之如例如在以下參考文獻中描述之任何聚乙二醇化反應來進行本發明之抗體或抗體片段之聚乙二醇化：Focus on Growth Factors 3:4-10 (1992)；EP 0 154 316；及EP 0 401 384，其各自全部以引入的方式併入本文中。在一態樣中，經由用反應性聚乙二醇分子(或類似反應性水溶性聚合物)進行醯化反應或烷基化反應來進行聚乙二醇化。適合於本發明之抗體及抗體片段之聚乙二醇化之水溶性聚合物為聚乙二醇(PEG)。如本文中所用，「聚乙二醇」意欲涵蓋已用於衍生其他蛋白質之任何形式之PEG，諸如單(C1-C10)烷氧基或芳氧基-聚乙二醇。

製備本發明之聚乙二醇化抗體及抗體片段之方法通常包

含步驟(a)在適合條件下使抗體或抗體片段與聚乙二醇(諸如PEG之反應性酯或醛衍生物)反應，藉以使抗體或抗體片段變得附接至一或多個PEG基團，及(b)獲得反應產物。一般技術者知曉基於已知參數及所需結果選擇最佳反應條件或醯化反應。

對於IL-12、TNF α 或IL-18具有特異性之聚乙二醇化抗體及抗體片段通常可用於藉由投與本文中描述之抗IL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體及抗體片段來治療本發明之IL-12相關、TNF α 相關或IL-18相關病症。通常與非聚乙二醇化之抗體及抗體片段相比，聚乙二醇化抗體及抗體片段具有增加之半衰期。聚乙二醇化抗體及抗體片段可單獨、一起或與其他醫藥組合物組合使用。

本發明之抗體或抗體部分可經衍生或連接至另一功能分子(例如另一肽或蛋白質)。因此，本發明之抗體及抗體部分意欲包括衍生形式及以不同方式修飾形式之本文中描述之人類抗hIL-12、抗TNF α 或抗hIL-18抗體，包括免疫黏附分子。舉例而言，本發明之抗體或抗體部分可與一或多個其他分子實體功能性連接(藉由化學偶合、基因融合、非共價締合或以其他方式)，該或該等分子實體諸如另一抗體(例如雙特異性抗體或雙功能抗體)、可偵測劑、細胞毒性劑、醫藥劑及/或可介導抗體或抗體部分與另一分子締合的蛋白質或肽(諸如抗生蛋白鏈菌素核心區或聚組胺酸標記)。

藉由使兩個或兩個以上抗體(相同類型或不同類型，例

如用於形成雙特異性抗體)交聯來產生一種類型之經衍生之抗體。適合交聯劑包括具有兩個由適當間隔基分隔之不同反應性基團的異型雙功能交聯劑(例如間馬來醯亞胺基苯甲醯基-N-羥基琥珀醯亞胺酯)或同型雙功能交聯劑(例如二琥珀醯亞胺基辛二酸酯)。該等連接劑可自Pierce Chemical Company, Rockford, IL獲得。

本發明之抗體或抗體部分可藉以衍生之適用可偵測劑包括螢光化合物。例示性螢光可偵測劑包括螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、5-二甲胺-1-萘磺醯氯、藻紅素及其類似物。抗體亦可經可偵測酶衍生，該等酶諸如鹼性磷酸酶、辣根過氧化酶、葡萄糖氧化酶及其類似酶。當抗體經可偵測酶衍生時，藉由添加其他試劑來偵測該抗體，該酶可使用該等試劑來產生可偵測反應產物。舉例而言，當存在可偵測劑辣根過氧化酶時，添加過氧化氫及二胺基聯苯胺產生顯色反應產物，其為可偵測的。抗體亦可經生物素衍生，且經由間接量測抗生物素蛋白或抗生蛋白鏈菌素結合來偵測。

7. 醫藥組合物

本發明之抗體及抗體部分可併入適於投與個體之醫藥組合物中。通常，醫藥組合物包含本發明之抗體或抗體部分及醫藥學上可接受之載劑。如本文中所用，「醫藥學上可接受之載劑」包括生理學上相容之任何及所有溶劑、分散介質、塗料、抗細菌劑及抗真菌劑、等滲及延遲吸收劑及其類似物。醫藥學上可接受之載劑之實例包括水、鹽水、

磷酸鹽緩衝鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物之一或多者以及其組合。在大多數情況下，需要將等滲劑(例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉)包括在組合物中。醫藥學上可接受之載劑可另外包含較少量的增強抗體或抗體部分之存放期或有效性的輔助物質，諸如潤濕劑或乳化劑、防腐劑或緩衝液。

本發明之抗體及抗體部分可併入適於非經腸投與之醫藥組合物中。抗體或抗體部分可製備為含有例如 0.1-250 mg/mL 抗體之可注射溶液。可注射溶液可由燧石玻璃(flint)或琥珀小瓶、安瓿或預填充之注射器中之液體或凍乾劑型構成。緩衝液可為 pH 值 5.0 至 7.0 (最佳 pH 值 6.0) 下之約 1-50 mM (最佳 5-10 mM) 之 L-組胺酸。其他適合緩衝液包括(但不限於)琥珀酸鈉、檸檬酸鈉、磷酸鈉或磷酸鉀。氯化鈉可用於以 0-300 mM 之濃度(對於液體劑型而言，最佳 150 mM)改良溶液之毒性。凍乾劑型可包括低溫保護劑，主要為 0-10% 蔗糖(最佳 0.5-1.0%)。其他適合低溫保護劑包括海藻糖及乳糖。凍乾劑型可包括增積劑，主要為 1-10% 甘露糖醇(最佳 24%)。液體及凍乾劑型中可使用穩定劑，主要為 1-50 mM L-甲硫胺酸(最佳 5-10 mM)。其他適合增積劑包括甘胺酸、精胺酸，可包括 0-0.05% 聚山梨醇酯-80(最佳 0.005-0.01%)。其他界面活性劑包括(但不限於)聚山梨醇酯 20 及 BRIJ 界面活性劑。

在一態樣中，醫藥組合物包括約 0.01 mg/kg-10 mg/kg 劑量之抗體。在另一態樣中，抗體劑量包括每隔一週投與約

1 mg/kg，或每週投與約0.3 mg/kg。習此相關技藝之人士可確定投與個體之適當劑量及方案。

本發明之組合物可呈各種形式。此等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、散劑、脂質體及栓劑。形式視例如預定投與模式及治療應用而定。典型組合物呈可注射或可輸注溶液之形式，諸如與用於以其他抗體對人類進行被動免疫之彼等組合物類似的組合物。一種投與模式為非經腸(例如靜脈內、皮下、腹膜內、肌肉內)。在一態樣中，藉由靜脈內輸注或注射投與抗體。在另一態樣中，藉由肌肉內或皮下注射投與抗體。

治療組合物通常必須在製造及儲存條件下為無菌且穩定的。組合物可調配為適合於較高藥物濃度之溶液、微乳液、分散液、脂質體或其他有序結構。若需要，可藉由將所需量之活性化合物(亦即抗體或抗體部分)與以上列舉之成份之一或以上列舉之成份之組合一起併入適當溶劑中，接著過濾滅菌來製備無菌可注射溶液。通常，藉由將活性化合物併入含有鹼性分散介質及來自以上列舉之彼等成份之所需其他成份的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌、凍乾散劑的情況下，製備方法為真空乾燥及噴霧乾燥，其產生活性成份加上來自其先前無菌過濾溶液之任何其他所需成份的散劑。可例如藉由使用塗料(諸如卵磷脂)、藉由維持所需粒徑(在分散液之情況下)及藉由使用界面活性劑來維持溶液之適當流動性。可

藉由將延遲吸收之藥劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)包括於組合物中來實現可注射組合物之延長吸收。

可藉由此項技術中已知之各種方法投與本發明之抗體及抗體部分，一種投與途徑/模式為皮下注射、靜脈內注射或輸注。如熟習此項技術者所瞭解，投與途徑及/或模式視所需結果而變化。在某些實施例中，活性化合物可與保護化合物避免快速釋放之載劑一起製備，諸如控制釋放調配物，包括植入物、經皮貼片及微囊封之遞送系統。可使用生物可降解、生物相容的聚合物，諸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白、聚原酸酯及聚乳酸。製備該等調配物之許多方法係取得專利權的或通常為熟習此項技術者所知。例如參見 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson編，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978，其全部教示以引用的方式併入本文中。

在某些態樣中，可例如藉由惰性稀釋劑或可同化之可食載劑來經口投與本發明之抗體或抗體部分。化合物(及其他成份，若需要)亦可封裝於硬殼或軟殼明膠膠囊中，壓縮成錠劑，或直接併入個體飲食中。對於經口治療性投與而言，化合物可與賦形劑合併且以可吸收性錠劑、口腔錠、糖衣錠、膠囊、酏劑、懸浮液、糖漿劑、糯米紙囊劑及其類似物之形式使用。為了藉由除非經腸以外之方式來投與本發明之化合物，可能需要用防止其失活之物質塗布化合物，或使化合物與防止其失活之物質一起共投與。

補充活性化合物亦可併入組合物中。在某些態樣中，本發明之抗體或抗體部分與一或多種適用於治療IL-12、TNF α 或IL-18活性為有害的病症之其他治療劑一起共調配及/或共投與。舉例而言，本發明之抗hIL-12、抗TNF α 或抗IL-18抗體或抗體部分可與一或多種結合其他標靶之其他抗體(例如結合其他細胞激素或結合細胞表面分子之抗體)一起共調配及/或共投與。此外，一或多種本發明之抗體可組合兩種或兩種以上上述治療劑使用。該等組合療法可有利地利用較低劑量之所投與之治療劑，由此避免與各種單一療法相關之可能毒性或併發症。習於此項技術之人士應瞭解當本發明之抗體用作組合療法之一部分時，與當抗體單獨投與個體時相比，可能需要較低劑量之抗體(例如可經由使用組合療法達成協同治療效果，其轉而容許使用較低劑量之抗體以達成所需治療效果)。

應瞭解本發明之抗體或其抗原結合部分可單獨使用或與其他藥劑(例如治療劑)組合使用，該其他藥劑由熟習此項技術者針對其預定目的來選擇。舉例而言，其他藥劑可為此項技術公認的適用於治療由本發明之抗體治療的疾病或病狀的治療劑。其他藥劑亦可為將有利特性賦予治療組合物的藥劑，例如影響組合物黏度的藥劑。

另外應瞭解包括於本發明內之組合為適用於其預定目的之彼等組合。以下闡述之藥劑為說明性的而非意欲具有限制性。作為本發明之一部分的組合可為本發明之抗體與至少一種選自以下清單之其他藥劑。若組合使得所形成之組

合物可執行其預定功能，則組合亦可包括一種以上其他藥劑，例如兩種或三種其他藥劑。

一些組合為包括如布洛芬(ibuprofen)之藥物的非類固醇消炎藥物，亦稱為NSAID。其他組合為包括潑尼龍(prednisolone)之皮質類固醇；當與本發明之抗體組合治療患者時，可藉由逐漸減少所需類固醇劑量來減少或甚至消除使用類固醇之熟知副作用。可與本發明之抗體或抗體部分組合之用於類風濕性關節炎的治療劑之非限制性實例包括以下：細胞激素抑制性消炎藥物(CSAID)；其他人類細胞激素或生長因子(例如TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF)之抗體或拮抗劑。本發明之抗體或其抗原結合部分可與細胞表面分子(諸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90)或其配位體(包括CD 154(gp39或CD40L))之抗體組合。

治療劑之一些組合可在自體免疫及後續發炎級聯中之不同點處干擾；實例包括TNF拮抗劑，如嵌合、人類化或人類TNF抗體、D2E7(1996年2月9日申請之美國申請案第08/599,226號，其全部教示以引用的方式併入本文中)、cA2(Remicade™)、CDP 571、抗TNF抗體片段(例如CDP870)及可溶性p55或p75 TNF受體、其衍生物(p75TNFR1gG(Enbrel™)或p55TNFR1gG(來那西普(Lenercept))、可溶性IL-13受體(sIL-13)，以及TNF α 轉化

酶(TACE)抑制劑；類似地，IL-1抑制劑(例如介白素-1-轉化酶抑制劑，諸如Vx740或IL-1RA等)出於相同原因可為有效的。其他組合包括介白素11、抗P7及p-選擇素醣蛋白配位體(PSGL)。其他組合涉及可與IL-12功能並行、視IL-12功能而定或與IL-12功能協同起作用之自體免疫反應之其他關鍵參與者；尤其包括IL-18拮抗劑(包括IL-18抗體或可溶性IL-18受體)或IL-18結合蛋白。已顯示IL-12及IL-18具有重疊但不同之功能且兩者之拮抗劑之組合最為有效。另一組合包括非消耗性抗CD4抑制劑。其他組合包括協同刺激路徑之拮抗劑CD80(B7.1)或CD86(B7.2)，包括抗體、可溶性受體或拮抗配位體。

本發明之抗體或其抗原結合部分亦可與諸如以下之藥劑組合：甲胺喋呤(methotrexate)、6-MP、硫唑嘌呤(azathioprine)柳氮磺吡啶(sulphasalazine)、美沙拉秦(mesalazine)、奧色拉秦(olsalazine)氯喹/羥氯喹、青黴胺(pencillamine)、硫代蘋果酸鈉(肌肉內及經口)、硫唑嘌呤、秋水仙鹼(cochicine)、皮質類固醇(經口、吸入及局部注射)、 β -2腎上腺素受體促效劑(沙丁胺醇(salbutamol)、特布他林(terbutaline)、沙美特羅(salmeteral))、黃嘌呤(茶鹼、胺茶鹼)、色甘酸鹽、奈多羅米(nedocromil)、酮替酚(ketotifen)、異丙托銨(ipratropium)及氧托銨(oxitropium)、環孢素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特(leflunomide)、NSAID(例如布洛芬)、皮質類固醇(諸如潑尼龍)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷

促效劑、抗血栓形成劑、補體抑制劑、腎上腺素劑、干擾促發炎性細胞激素(諸如 TNF α 或 IL-1)之信號傳導的藥劑(例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制劑)、IL-1 β 轉化酶抑制劑(例如 Vx740)、抗 P7、p-選擇素糖蛋白配位體(PSGL)、TNF α 轉化酶(TACE)抑制劑、T 細胞信號傳導抑制劑(諸如激酶抑制劑)、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體及其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受體及衍生物 p75 TNFRIgG(Enbrel.TM.)及 p55 TNFRIgG(來那西普)、sIL-1 RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性 IL-13 受體(sIL-13))及消炎細胞激素(例如 IL-4、IL-10、IL-11、IL-13 及 TGF β)。一些組合包括甲胺喋呤或來氟米特且在中度或嚴重類風濕性關節炎之病例中包括環孢素。

可與本發明之抗體或抗體部分組合之用於發炎性腸道疾病的治療劑之非限制性實例包括以下：布替耐德(budenoside)、表皮生長因子、皮質類固醇、環孢素、柳氮磺胺吡啶、胺基水楊酸鹽、6-巰基嘌呤、硫唑嘌呤、甲硝達唑(metronidazole)、脂肪加氧酶抑制劑、美沙拉嗪(mesalamine)、奧色拉秦、巴柳氮(balsalazide)、抗氧化劑、血栓素抑制劑、IL-1 受體拮抗劑、抗 IL-1 α 單株抗體、抗 IL-6 單株抗體、生長因子、彈性酶抑制劑、吡啶基咪唑化合物、其他人類細胞激素或生長因子(例如 TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF 及 PDGF)之抗體或拮抗劑。本發

明之抗體或其抗原結合部分可與細胞表面分子(諸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD90)或其配位體之抗體組合。本發明之抗體或其抗原結合部分亦可與諸如以下之藥劑組合：甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAID(例如布洛芬)、皮質類固醇(諸如潑尼龍)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓形成劑、補體抑制劑、腎上腺素劑、干擾促發炎性細胞激素(諸如TNF α 或IL-1)之信號傳導的藥劑(例如IRAK、NIK、IKK、p38或MAP激酶抑制劑)、IL-1 β 轉化酶抑制劑(例如Vx740)、抗P7、p-選擇素糖蛋白配位體(PSGL)、TNF α 轉化酶抑制劑、T細胞信號傳導抑制劑(諸如激酶抑制劑)、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體及其衍生物(例如可溶性p55或p75 TNF受體、sIL-1RI、sIL-1RII、sIL-6R、可溶性IL-13受體(sIL-13))及消炎細胞激素(例如IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及TGF β)。

可與抗體或抗原結合部分組合之用於克羅恩氏病(Crohn's disease)的治療劑之實例包括以下：TNF拮抗劑，例如抗TNF抗體、D2E7(1996年2月9日申請之美國申請案第08/599,226號，其全部教示以引用的方式併入本文中)、cA2(Remicade™)、CDP 571、抗TNF抗體片段(例如CDP870)、TNFR-Ig構築體(p75TNFRIgG(Enbrel™)及p55TNFRIgG(來那西普))、抗P7、p-選擇素糖蛋白配位體

(PSGL)、可溶性IL-13受體(sIL-13)及PDE4抑制劑。本發明之抗體或其抗原結合部分可與皮質類固醇(例如布替耐德及地塞米松(dexamethasone))組合。本發明之抗體或其抗原結合部分亦可與諸如柳氮磺胺吡啶、5-氨基水楊酸及奧色拉秦之藥劑及干擾促發炎性細胞激素(諸如IL-1)之合成或作用之藥劑(例如IL-1轉化酶抑制劑(例如Vx740)及IL-1ra)組合。本發明之抗體或其抗原結合部分亦可與T細胞信號傳導抑制劑(例如酪胺酸激酶抑制劑6-巰基嘌呤)一起使用。本發明之抗體或其抗原結合部分可與IL-11組合。

可與本發明之抗體或抗體部分組合之用於多發性硬化症的治療劑之非限制性實例包括以下：皮質類固醇、潑尼龍、甲潑尼龍、硫唑嘌呤、環磷醯胺、環孢素、甲胺喋呤、4-氨基吡啶、替紫尼定(tizanidine)、IFN β 1a(阿溫耐克斯(Avonex)；Biogen)、IFN β 1b(倍泰龍(Betaseron)；Chiron/Berlex)、共聚物1(Cop-1，克帕松(Copaxone)，Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)、高壓氧、靜脈內免疫球蛋白、克拉屈濱(clabribine)、其他人類細胞激素或生長因子(例如TNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF及PDGF)之抗體或拮抗劑。本發明之抗體或其抗原結合部分可與細胞表面分子(諸如CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90)或其配位體之抗體組合。本發明之抗體或其抗原結合部分亦可

與諸如以下之藥劑組合：甲胺喋呤、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸嗎啉乙酯、來氟米特、NSAID(例如布洛芬)、皮質類固醇(諸如潑尼龍)、磷酸二酯酶抑制劑、腺苷促效劑、抗血栓形成劑、補體抑制劑、腎上腺素劑、干擾促發炎性細胞激素(諸如 TNF α 或 IL-1)之信號傳導的藥劑(例如 IRAK、NIK、IKK、p38 或 MAP 激酶抑制劑)、IL-1 β 轉化酶抑制劑(例如 Vx740)、抗 P7、p-選擇素糖蛋白配位體(PSGL)、TACE 抑制劑、T 細胞信號傳導抑制劑(諸如激酶抑制劑)、金屬蛋白酶抑制劑、柳氮磺胺吡啶、硫唑嘌呤、6-巰基嘌呤、血管緊張素轉化酶抑制劑、可溶性細胞激素受體及其衍生物(例如可溶性 p55 或 p75 TNF 受體、sIL-1 RI、sIL-1 RII、sIL-6R、可溶性 IL-13 受體(sIL-13))及消炎細胞激素(例如 IL-4、IL-10、IL-13 及 TGF β)。

可與抗體或其抗原結合部分組合之用於多發性硬化症的治疗劑之實例包括 IFN β (例如 IFN β 1a 及 IFN β 1b)、克帕松、皮質類固醇、IL-1 抑制劑、TNF 抑制劑及 CD40 配位體及 CD80 之抗體。

本發明之醫藥組合物可包括「治療有效量」或「預防有效量」之本發明之抗體或抗體部分。「治療有效量」係指在必要劑量及時段下有效達成所需治療結果的量。抗體或抗體部分之治療有效量可根據諸如個體之疾病病況、年齡、性別及體重及抗體或抗體部分引起個體之所需反應之能力的因素而變化。治療有效量亦為治療有利效果超過抗體或抗體部分之任何毒性或有害影響的量。「預防有效

量」係指在必要劑量及時段下有效達成所需預防結果的量。通常，因為預防劑量在疾病之前或在疾病早期用於個體中，所以預防有效量少於治療有效量。

可調整給藥方案以提供最佳所需反應(例如治療或預防反應)。舉例而言，可投與單次大丸劑，可隨時間投與若干分次劑量或如治療情況之緊急需要所指示，可按比例減少或增加劑量。在某些實施例中，以便於投與且劑量均一之單位劑型來調配非經腸組合物為尤其有利的。如本文中所用之單位劑型係指適合作為待要治療之哺乳動物個體之單一劑量的實體上離散單位；各單位包含與所需醫藥載劑締合的經計算可產生所需治療效果的預定數量之活性化合物。本發明之單位劑型的規格由以下決定且直接視其而定，(a)活性化合物之獨特特徵及待達成之特定治療或預防效果，及(b)混配該活性化合物以治療個體敏感性之此項技術中所固有的限制。

本發明之抗體或抗體部分之治療或預防有效量之例示性、非限制性範圍為0.01-20 mg/kg或1-10 mg/kg或0.3-1 mg/kg。應注意劑量值可隨待要減輕之病狀之類型及嚴重程度而變化。另外應瞭解對於任何特定個體，應根據個體需要及投與組合物或監督組合物投與之人士的專業判斷來隨時間調整特定給藥方案，且本文中闡述之劑量範圍僅為例示性的且不欲限制所主張之組合物之範圍或實務。

8. 本發明之抗體之用途

8.1. 抗IL-12抗體一般用途

既然能夠與IL-12結合，則可利用習知免疫檢定(諸如酶聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫檢定(RIA)或組織免疫組織化學)來使用本發明之抗IL-12抗體或其部分偵測(例如樣品基質中，在一態樣中為生物樣品(諸如血清或血漿))IL-12，在一態樣中為hIL-12。本發明提供偵測生物樣品中之IL-12之方法，其包含使樣品與本發明之抗體或抗體部分接觸且偵測與IL-12結合之抗體(或抗體部分)或未結合之抗體(或抗體部分)，由此偵測樣品中之IL-12。直接或間接以可偵測物質標記抗體以有助於偵測結合或未結合之抗體。適合可偵測物質包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質及放射性物質。適合酶之實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；適合螢光物質之實例包括繖酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、二甲胺基磺基鹵或藻紅素；發光物質之實例包括魯米諾(luminol)；且適合放射性物質之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。偵測樣品中之IL-12可適用於診斷情形中，例如適用於診斷與IL-12增加相關之病狀，且/或可適用於識別可受益於用抗IL-12抗體治療之個體。

代替對抗體進行標記，可藉由利用例如經可偵測物質標記之rhIL-12標準物及未經標記抗IL-12抗體(諸如抗hIL-12抗體)的競爭免疫檢定來檢定樣品中之IL-12。在此檢定中，將樣品、經標記rhIL-12標準物及抗hIL-12抗體組合且

測定與未經標記之抗體結合之經標記 rhIL-12 標準物之量。樣品中之 hIL-12 之量與結合至抗 hIL-12 抗體之經標記 rhIL-12 標準物之量成反比。

本發明之抗體及抗體部分能夠在活體外及活體內中和 IL-12 活性，在一態樣中中和 hIL-12 活性。因此，本發明之抗體及抗體部分可用於抑制例如含有 IL-12 之細胞培養物、人類個體或具有 IL-12 與本發明之抗體交叉反應之其他哺乳動物個體(例如靈長類，諸如狒狒、獼猴及恆河猴)中之 IL-12 活性。在一態樣中，本發明提供經分離之人類抗體或其抗原結合部分，其中和人類 IL-12 及至少一種選自由狒狒 IL-12、狨猴 IL-12、黑猩猩 IL-12、獼猴 IL-12 及恆河猴 IL-12 組成之群之其他靈長類 IL-12 之活性，但不中和小鼠 IL-12 之活性。在一態樣中，IL-12 為人類 IL-12。舉例而言，在含有 hIL-12 或懷疑含有 hIL-12 之細胞培養物中，可將本發明之抗體或抗體部分添加至培養基中以抑制培養物中 hIL-12 之活性。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制罹患 IL-12 活性為有害的病症之個體之 IL-12 活性的方法。IL-12 已與廣泛多種病症之病理生理異常有關聯(Windhagen 等人，(1995) J. Exp. Med. 182: 1985-1996；Morita 等人(1998) Arthritis and Rheumatism. 41: 306-314；Bucht 等人(1996) Clin. Exp. Immunol. 103: 347-367；Fais 等人(1994) J. Interferon Res. 14:235-238；Pyrronchi 等人(1997) Am. J. Path. 150:823-832；Monteleone 等人(1997) Gastroenterology. 112:1169-

1178 及 Berrebi 等人 (1998) Am. J. Path 152:667-672 ; Pyrronchi 等人 (1997) Am. J. Path. 150:823-832 , 其全部教示以引用的方式併入本文中)。本發明提供抑制罹患該病症之個體之 IL-12 活性之方法，該方法包含向個體投與本發明之抗體或抗體部分以使得抑制個體之 IL-12 活性。在一態樣中，IL-12 為人類 IL-12 且個體為人類個體。或者，個體可為表現與本發明之抗體交叉反應之 IL-12 的哺乳動物。另外，個體可為引入 hIL-12 之哺乳動物(例如藉由投與 hIL-12 或藉由表現 hIL-12 轉殖基因)。可出於治療目的將本發明之抗體投與人類個體。另外，可出於獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型，將本發明之抗體投與表現與抗體交叉反應之 IL-12 的非人類哺乳動物。關於後者，該等動物模型可適用於評定本發明抗體之治療功效(例如測試投與劑量及時程)。

如本文中所用，短語「IL-12 活性為有害的病症」意欲包括已顯示或懷疑罹患病症之個體中 IL-12 之存在造成病症之病理生理異常或作為引起病症惡化之因素的疾病及其他病症。因此，IL-12 活性為有害的病症為抑制 IL-12 活性預期會減輕病症症狀及/或減緩病症進程的病症。舉例而言，可例如使用如上所述之抗 IL-12 抗體偵測罹患病症之個體之生物流體中 IL-12 濃度之增加(例如個體之血清、血漿、滑液等中之 IL-12 濃度之增加)，從而證明該等病症。存在 IL-12 活性為有害的病症之許多實例。在一態樣中，可在治療本文中描述之疾病或病症之療法中使用抗體或其

抗原結合部分。在另一態樣中，抗體或其抗原結合部分可用於製造治療本文中描述之疾病或病症之醫藥。以下另外討論本發明之抗體及抗體部分在治療若干非限制性特定病症中之用途。

介白素12在與各種涉及免疫及發炎要素之疾病相關的病理中有關鍵性作用。此等疾病包括(但不限於)類風濕性關節炎、骨關節炎、幼年型慢性關節炎、萊姆氏關節炎(Lyme arthritis)、牛皮癬性關節炎、反應性關節炎、脊椎關節病、全身性紅斑性狼瘡症、克羅恩氏病、潰瘍性結腸炎、發炎性腸道疾病、胰島素依賴型糖尿病、甲狀腺炎、哮喘、過敏性疾病、牛皮癬、皮炎硬皮病、異位性皮炎、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥、與器官移植相關之急性或慢性免疫疾病、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、彌漫性血管內凝血、川崎氏疾病(Kawasaki's disease)、格雷氏病(Grave's disease)、腎病症候群、慢性疲勞症候群、華格納氏肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schoenlein purpura)、腎臟顯微性脈管炎、慢性活動性肝炎、葡萄膜炎、敗血性休克、中毒性休克症候群、敗血症候群、惡病質、傳染性疾病、寄生蟲疾病、後天免疫缺乏症候群、急性橫貫性脊髓炎、亨廷頓氏舞蹈病(Huntington's chorea)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)、中風、原發性膽汁性肝硬化、溶血性貧血、惡性腫瘤、心臟衰竭、心肌梗塞、阿狄森氏病(Addison's disease)、偶發性多腺缺乏症I型及

多腺缺乏症II型、施密特氏症候群(Schmidt's syndrome)、成年(急性)呼吸窘迫症候群、禿髮、斑禿、血清陰性關節病、關節病、萊特爾氏病(Reiter's disease)、牛皮癬性關節病、潰瘍性結腸關節病、腸病性滑膜炎、衣原體、耶氏桿菌(yersinia)及沙門氏菌(salmonella)相關之關節病、脊椎關節病、粉瘤疾病/動脈硬化、特異性過敏症、自體免疫大皰疾病、尋常天疱瘡、葉型天疱瘡、類天疱瘡、線性IgA疾病、自體免疫溶血性貧血、庫姆氏(Coombs)陽性溶血性貧血、後天惡性貧血、幼年型惡性貧血、肌痛性腦炎/慢性疲勞症候群(Royal Free Disease)、慢性皮膚黏膜念珠菌病、巨細胞性動脈炎、原發性硬化肝炎、隱原性自體免疫肝炎、後天免疫缺乏疾病症候群、後天免疫缺乏相關疾病、C型肝炎、常見變異免疫缺乏(常見變異性低 γ 球蛋白血症)、擴張心肌病、女性不育症、卵巢衰竭、卵巢早衰、纖維變性肺病、隱原性纖維化肺泡炎、發炎後間質肺病、間質肺炎、結締組織病相關之間質肺病、混合性結締組織病相關之肺病、全身性硬化症相關之間質肺病、類風濕性關節炎相關之間質肺病、全身性紅斑性狼瘡症相關之肺病、皮膚炎/多發性肌炎相關之肺病、休格連氏(Sjodgren's)病相關之肺病、強直性脊椎炎相關之肺病、脈管炎擴散肺病、血黃素沈積症相關之肺病、藥物誘導之間質肺病、放射性纖維化、閉塞性細支氣管炎、慢性嗜伊紅血球性肺炎、淋巴球性滲透性肺病、感染後間質肺病、痛風性關節炎、自體免疫肝炎、I型自體免疫肝炎(傳統自體

免疫或狼瘡樣肝炎)、2型自體免疫肝炎(抗LKM抗體肝炎)、自體免疫介導之低血糖症、B型胰島素抵抗伴黑棘皮病、副甲狀腺低能症、與器官移植相關之急性免疫疾病、與器官移植相關之慢性免疫疾病、骨關節炎、原發性硬化性膽管炎、特發性白細胞減少症、自體免疫嗜中性球減少症、腎病NOS、絲球體腎炎(glomerulonephritis)、腎臟顯微性血管炎、萊姆病、盤狀紅斑性狼瘡、男性不育症(特發性或NOS)、精液自體免疫性、多發性硬化症(所有亞型)、胰島素依賴型糖尿病、交感性眼炎、結締組織病繼發性肺循環血壓過高、古德帕斯徹氏症候群(Goodpasture's syndrome)、結節性多動脈炎之肺部表現、急性風濕熱、類風濕性脊椎炎、史提爾氏病(Still's disease)、全身性硬化症、高安氏(Takayasu's)病/動脈炎、自體免疫血小板減少症、特發性血小板減少症、自體免疫性甲狀腺病、甲狀腺機能亢進、甲狀腺腫自體免疫甲狀腺功能低下(橋本氏病(Hashimoto's disease))、萎縮性自體免疫甲狀腺功能低下、原發性黏液水腫、晶狀體源性葡萄膜炎、原發性脈管炎及白斑症。本發明之人類抗體及抗體部分可用於治療自體免疫疾病，尤其與發炎相關之疾病，包括類風濕性脊椎炎、過敏症、自體免疫糖尿病及自體免疫葡萄膜炎。

在某些態樣中，本發明之抗體或其抗原結合部分用於治療類風濕性關節炎、克羅恩氏病、多發性硬化症、胰島素依賴型糖尿病及牛皮癬。

8.2 抗IL-12抗體在類風濕性關節炎中之用途

介白素-12已涉及在發炎疾病(諸如類風濕性關節炎)中起作用。已在來自類風濕性關節炎患者之滑液中偵測到誘導性IL-12p40訊息且已顯示IL-12存在於患有類風濕性關節炎之患者滑液中(例如參見Morita等人(1998) *Arthritis and Rheumatism* 41: 306-314, 其全部教示以引用的方式併入本文中)。已發現IL-12陽性細胞存在於類風濕性關節炎滑膜之襯裏下層中。本發明之人類抗體及抗體部分可用於治療例如類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、萊姆關節炎、類風濕性脊椎炎、骨關節炎及痛風性關節炎。通常, 全身投與抗體或抗體部分, 惟對於某些病症而言, 局部投與抗體或抗體部分可為有利的。本發明之抗體或抗體部分亦可與一或多種適用於治療自體免疫疾病之其他治療劑一起投與。

在類風濕性關節炎之膠原蛋白誘導之關節炎(CIA)鼠類模型中, 在關節炎之前用抗IL-12 mAb(大鼠抗小鼠IL-12單株抗體, C17.15)處理小鼠可極深地抑制發作, 且降低疾病發生率及嚴重程度。在關節炎發作之後較早地用抗IL-12 mAb處理可降低嚴重程度, 但在疾病發作之後較遲地用抗IL-12 mAb處理小鼠對於疾病嚴重程度僅具有最低限度的作用。

8.3 抗IL-12抗體在克羅恩氏病中之用途

介白素-12亦在發炎性腸道疾病克羅恩氏病中起作用。IFN- γ 及IL-12在患有克羅恩氏病之患者腸黏膜中之表現增加(例如參見Fais等人(1994) *J. Interferon Res.* 14: 235-

238 ; Pyrronchi等人(1997) Amer. J. Pathol. 150: 823-832 ; Monteleone等人(1997) Gastroenterology 112: 1169-1178 ; Berrebi等人(1998) Amer. J. Pathol. 152: 667-672 , 其全部教示以引用的方式併入本文中)。已顯示抗IL-12抗體在結腸炎之小鼠模型(例如TNBS誘導之結腸炎IL-2基因剔除小鼠)中, 且最近在IL-10基因剔除小鼠中可抑制疾病。因此, 本發明之抗體及抗體部分可用於治療發炎性腸道疾病。

8.4 抗IL-12抗體在多發性硬化症中之用途

介白素-12已作為多發性硬化症之關鍵介體有牽連。可在患有多發性硬化症之患者病灶中顯示誘導性IL-12 p40訊息或IL-12本身之表現(Windhagen等人(1995) J. Exp. Med 182: 1985-1996, Drulovic等人(1997) J. Neurol. Sci. 147:145-150, 其全部教示以引用的方式併入本文中)。患有多發性硬化症之慢性進行性患者具有較高循環水準之IL-12。對患有多發性硬化症之患者T細胞及抗原呈現細胞(APC)之研究揭示一系列自我持續性免疫相互作用, 其為導致Th1型免疫反應之進行性多發性硬化症之基礎。T細胞分泌增加之IFN- γ 會導致APC產生之IL-12增加, 其使導致長期狀態之Th1型免疫活化及疾病之循環得以持續(Balashov等人(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 599-603, 其全部教示以引用的方式併入本文中)。已使用多發性硬化症之小鼠及大鼠實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)模型研究IL-12在多發性硬化症中之作用。在小鼠多發性硬化症之

復發-緩解EAE模型中，用抗IL-12 mAb預處理可延緩麻痺且減少臨床計分。在麻痺峰荷下或在後續緩解階段過程中，用抗IL-12 mAb處理可減少臨床計分。因此，本發明之抗體或其抗原結合部分可用來減輕人類之與多發性硬化症相關之症狀。

8.5 抗IL-12抗體在胰島素依賴型糖尿病中之用途

介白素-12已作為胰島素依賴型糖尿病(IDDM)之重要介體有牽連。在NOD小鼠中藉由投與IL-12來誘導IDDM，且抗IL-12抗體在IDDM之過繼轉移模型中為保護性的。初期發作IDDM患者通常經歷所謂「蜜月階段」，在此期間一些殘餘胰島細胞功能得以維持。此等殘餘胰島細胞產生胰島素且與所投與之胰島素相比，更好地調節血糖含量。用抗IL-12抗體治療此等初期發作患者可預防胰島細胞進一步被破壞，由此維持胰島素之內源性來源。

8.6 抗IL-12抗體在牛皮癬中之用途

介白素-12已作為牛皮癬之關鍵介體有牽連。牛皮癬涉及與TH 1型細胞激素表現概況相關之急性及慢性皮膚損害。(Hamid等人(1996) J. Allergy Clin. Immunol. 1:225-231; Turka等人(1995) Mol. Med. 1:690-699，其全部教示以引用的方式併入本文中)。在患病人類皮膚樣品中偵測到IL-12 p35及p40 mRNA。因此，本發明之抗體或其抗原結合部分可用來減輕諸如牛皮癬之慢性皮膚病症。

8.7 抗IL-18抗體之一般用途

既然能夠與IL-18結合，則可利用習知免疫檢定(諸如酶

聯免疫吸附檢定(ELISA)、放射免疫檢定(RIA)或組織免疫組織化學)來使用本發明之抗IL-18抗體或其部分偵測(例如樣品基質中，在一態樣中為生物樣品(諸如血清或血漿)中)IL-18，在一態樣中為hIL-18。本發明提供一種偵測生物樣品中之IL-18之方法，其包含使樣品與本發明之抗體或抗體部分接觸且偵測與IL-18結合之抗體(或抗體部分)或未結合之抗體(或抗體部分)，由此偵測樣品中之IL-18。直接或間接以可偵測物質標記抗體以有助於偵測結合或未結合之抗體。適合可偵測物質包括各種酶、輔基、螢光物質、發光物質及放射性物質。適合酶之實例包括辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；適合輔基複合物之實例包括抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生物素蛋白/生物素；適合螢光物質之實例包括繖酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯或藻紅素；發光物質之實例包括魯米諾；且適合放射性物質之實例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。偵測樣品中之IL-18可適用於診斷情形中，例如適用於診斷與IL-18增加相關之病狀，且/或可適用於識別可受益於用抗IL-18抗體治療之個體。

代替對抗體進行標記，可藉由利用例如經可偵測物質標記之rhIL-18標準物及未經標記抗IL-18抗體(諸如抗hIL-18抗體)的競爭免疫檢定來檢定樣品中之IL-18。在此檢定中，將樣品、經標記rhIL-18標準物及抗hIL-18抗體組合且測定與未經標記抗體結合之經標記rhIL-18標準物之量。樣

品中hIL-18之量與結合至抗hIL-18抗體之經標記rhIL-18標準物之量成反比。

本發明之抗體及抗體部分能夠在活體外及活體內中和IL-18活性，在一態樣中中和hIL-18活性。因此，本發明之抗體及抗體部分可用於抑制例如含有IL-18之細胞培養物、人類個體或具有IL-18與本發明之抗體交叉反應之其他哺乳動物個體(例如靈長類，諸如狒狒、獼猴及恆河猴)中之IL-18活性。在一態樣中，本發明提供一種經分離之人類抗體或其抗原結合部分，其中和人類IL-18及至少一種選自由狒狒IL-18、猿猴IL-18、黑猩猩IL-18、獼猴IL-18及恆河猴IL-18組成之群之其他靈長類IL-18之活性，但不中和小鼠IL-18之活性。在一態樣中，IL-18為人類IL-18。舉例而言，在含有或懷疑含有hIL-18之細胞培養物中，可將本發明之抗體或抗體部分添加至培養基以抑制培養物中之hIL-18活性。

在另一態樣中，本發明提供一種抑制罹患IL-18活性為有害的病症之個體之IL-18活性的方法。介白素18在與各種涉及免疫及發炎要素之疾病相關的病變中發揮關鍵性作用。

如本文中所用，短語「IL-18活性為有害的病症」意欲包括已顯示或懷疑罹患病症之個體中IL-18之存在會造成病症之病理生理異常或作為引起病症惡化之因素的疾病及其他病症。因此，IL-18活性為有害的病症為抑制IL-18活性預期會減輕病症症狀及/或減緩病症進程的病症。舉例

而言，可例如使用如上所述之抗IL-18抗體偵測罹患病症之個體之生物流體中IL-18濃度之增加(例如個體之血清、血漿、滑液等中之IL-18濃度之增加)，從而證明該等病症。存在IL-18活性為有害的病症之許多實例。在一態樣中，可在治療本文中描述之疾病或病症之療法中使用抗體或其抗原結合部分。在另一態樣中，抗體或其抗原結合部分可用於製造治療本文中描述之疾病或病症之醫藥。以下另外討論本發明之抗體及抗體部分在治療若干非限制性特定病症中之用途。

本發明提供用於治療需要調節IL-18活性之疾病或病狀之醫藥組合物。此等疾病或病狀包括自體免疫疾病、I型糖尿病、類風濕性關節炎、移植排斥、發炎性腸道疾病、敗血症、多發性硬化症、缺血性心臟病(包括心臟病發作)、缺血性腦損傷、慢性肝炎、牛皮癬、慢性胰腺炎、急性胰腺炎及其類似疾病或病狀。

因此，指示抗IL-18抗體或其抗原結合部分，或活體內表現該等抗體或其抗原結合部分之載體用於治療自體免疫疾病、I型糖尿病、類風濕性關節炎、移植排斥、發炎性腸道疾病、敗血症、多發性硬化症、缺血性心臟病(包括急性心臟病發作)、缺血性腦損傷、慢性肝炎、牛皮癬、慢性胰腺炎及急性胰腺炎及類似疾病，IL-18在該等疾病中異常表現，導致IL-18過量，或其中歸因於外源投與之IL-18而出現併發症。

8.8 抗IL-18抗體在肝臟損傷中之用途

本發明之一態樣為提供一種治療及/或預防肝臟損傷之新穎方法。已發現IL-18抑制劑可有效地預防及治療肝臟損傷。因此，本發明亦係關於IL-18抑制劑用於製造供治療及/或預防肝臟損傷之藥物的用途。更特定言之，本發明係關於治療及/或預防由酒精性肝炎、病毒性肝炎、免疫肝炎、暴發性肝炎、肝硬化及原發性膽汁性肝硬化所引起之肝臟損傷。

8.9 抗IL-18抗體在關節炎中之用途

根據本發明，亦已發現IL-18之抑制劑可有效地治療關節炎。治療效果包括降低疾病嚴重程度以及預防疾病蔓延。因此，本發明係關於IL-18抑制劑用於治療及/或預防關節炎之用途。此發現為出乎意外的，此歸因於根據以上概述之技術現狀，尚未得出結論阻斷涉及關節炎之一個特異性因子(亦即介白素IL-18)會導致減輕關節炎或甚至治癒患關節炎之關節。

術語「關節炎」包括如例如在華盛頓大學(the University of Washington)之矯形學系(the Department of Orthopaedics)之主頁中對於關節炎所定義之所有不同類型之關節炎及關節炎病狀(急性及慢性關節炎兩者)。關節炎病狀之實例為強直性脊椎炎、背痛、腕骨沈積症候群、艾登二氏症候群、痛風、幼年型關節炎、紅斑性狼瘡、肌炎、成骨不全、骨質疏鬆症、多發性關節炎、多發性肌炎、牛皮癬性關節炎、萊特爾氏症候群、硬皮病、關節炎伴腸道疾病、白塞氏病(Behcets's disease)、兒童關節炎、

變性關節病、肌肉纖維疼痛、感染性關節炎、萊姆病、馬凡氏症候群(Marfan syndrome)、骨關節炎、骨壞死、佩吉特氏病(Pagets Disease)、風濕性多肌痛、假性痛風、反射性交感神經失養症、類風濕性關節炎、風濕病、休格連氏症候群、家族性腺瘤性息肉病及其類似病狀。

類風濕性關節炎(RA)導致關節襯層(滑膜，一層上皮細胞)及/或內臟發炎。該疾病趨向於持續多年，通常影響遍及全身之許多不同關節且最終可損害軟骨、骨骼、腱及韌帶。可受RA影響之關節為例如位於頸、肩、肘、臀、腕、手、膝、踝及足中之關節。在許多情況下，RA中之關節呈對稱模式發炎。

在美國，RA在約1%之人群中流行，分布於所有種族及年齡內。其在世界各處出現，且在患有RA之人中，女性以3:1在數量上超過男性。

已發現投與IL-18抑制劑可顯著減弱關節炎鼠類模型中之軟骨病損。因此，本發明亦係關於IL-18抑制劑在製造供治療及/或預防軟骨破壞之藥物中的用途。

8.10 抗TNF α 抗體之一般用途

腫瘤壞死因子- α 為主要由單核細胞/巨噬細胞分泌之多功能促發炎性細胞激素，其對脂質代謝、凝血、胰島素抵抗及內皮功能有影響。TNF α 為17 kD蛋白質次單位之可溶性均三聚物。亦存在膜結合26 kD前驅物形式之TNF α 。其出現於組織中之滑膜細胞及巨噬細胞中。除單核細胞或巨噬細胞以外之細胞亦產生TNF α 。舉例而言，人類非單核細

胞性腫瘤細胞株產生TNF α 以及CD4⁺及CD8⁺末梢血液T淋巴細胞且一些經培養之T及B細胞株產生TNF α 。其與類風濕性關節炎有關，但非其所獨有，且出現於許多發炎疾病中。TNF α 之受體處於若干單核細胞上，在滑膜以及末梢血液及滑液中。TNF α 為類風濕性關節炎中之關鍵性發炎介體，且因此可為特定免疫療法之適用標靶。

TNF α 會導致引起組織損傷之促發炎性作用，諸如降解軟骨及骨骼、誘導黏附分子、誘導血管內皮細胞之促凝血活性、增加嗜中性白血球及淋巴細胞之黏附，及刺激巨噬細胞、嗜中性白血球及血管內皮細胞釋放血小板活化因子。最近證據將TNF α 與感染、免疫病症、贅生性病變、自體免疫病變及移植物抗宿主病變相關聯。

咸信TNF α 在革蘭氏陰性敗血症及內毒素性休克(包括發燒、不適、厭食症及惡病質)中起著重要作用。內毒素可強烈活化單核細胞/巨噬細胞產生及TNF α 及其他細胞激素之分泌。TNF α 及其他源自單核細胞之細胞激素可介導對於內毒素之代謝及神經激素反應。內毒素投與人類自願者會產生具有流感樣症狀之急性疾病，該等症狀包括發燒、心跳過速、代謝率增加及應激激素釋放。在罹患革蘭氏陰性敗血症之患者中，循環TNF α 增加。

因此，TNF α 已與發炎疾病、自體免疫疾病、病毒性、細菌性及寄生性感染、惡性腫瘤及/或神經退化性疾病有關聯且為治療諸如類風濕性關節炎及克羅恩氏病之疾病之特定生物學療法的適用標靶。已報導使用TNF α 之嵌合單

株抗體進行開放標籤試驗之有利效果，其中發炎得到抑制且在類風濕性關節炎及克羅恩氏病復發之後進行了成功再治療。

已在哺乳動物中顯示，在實驗性內毒素血症及菌血症中之致命激發之後，TNF α 之中和性抗血清或mAb會中止不利生理變化且防止死亡。阿達木單抗(亦由其商標HUMIRA®而為吾人所知，其可自Abbott Laboratories獲得)為對於TNF α 具有特異性之重組人類單株抗體。此單株抗體結合至TNF α 且阻斷其與p55及p75細胞表面TNF α 受體之相互作用。此單株抗體對於TNF α 具有完全特異性，此歸因於其似乎不抑制TNF β 活性。在補體存在下，阿達木單抗可溶解表現TNF α 之細胞表面。

實例

1. 純化及分離抗IL-18抗體過程中之病毒清除

此研究之目的為評定抗IL-18抗體之純化方法之病毒清除有效性。評定之步驟包括低pH值去活化、陽離子交換捕獲層析(Fractogel™ EMD S03-樹脂)、陰離子交換層析(Q-Sepharose™ FF樹脂)及疏水性相互作用層析(苯基Sepharose™ HP樹脂)精細純化層析。此研究符合關於在藥物製造過程中藉由正交方法清除病毒之ICH準則。

研究涵蓋兩種病毒之清除，異嗜性鼠類白血病反轉錄病毒(X-MuLV或X-MLV)及小鼠微小病毒(MVM或MMV)。遵循ICH準則，選擇兩種病毒以「模擬會污染產物之病毒且表現廣泛範圍之物理化學性質以便測試系統一般消除病毒

之能力」。(參見公布於1998年9月24日星期四/第63卷，第185期/通告中之「Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived From Cell Lines of Human or Animal Original」(<http://www.fds.gov/cber/gdlns/virsafe.pdf>), 其整個教示以引用的方式併入本文中。)兩種病毒之性質提供於表2中。選擇反轉錄病毒X-MLV作為特定模型病毒，此歸因於通常在鼠類來源之細胞株中發現非感染性反轉錄病毒樣顆粒，該等細胞株諸如中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括用於產生抗體(諸如抗IL-18抗體)之CHO細胞株。對物理化學去活化具有高度抗性之MVM可視為相關病毒，此歸因於若干報導指示其存在於若干批之CHO細胞培養上清液中(R.L. Garnick, Dev. Biol. Stand., 88，第49-56頁(1996))。MVM與鼠類微小病毒MMV同義。

表2 病毒特徵

病毒	家族	ICH病毒種類	基因組	包膜?	尺寸(nm)	物理化學抗性
異嗜性鼠類白血病毒(X-MuLV)	反轉錄	特定模型	ss RNA	是	80-110	低
小鼠微小病毒(MVM)	小病毒	相關	ss DNA	否	20-35	極高

1.1 方法

根據圖4中概述之方案執行此研究。以進料流中之濃病毒加料(病毒加料體積1-7.1% v/v)激發各過程步驟。針對病毒計數對裝載物流、產物流及同步對照流(hold control

stream)進行檢定，且測定各步驟之對數降低因數。

一式兩份運作各過程步驟(參見圖4)。在如表4中所示之正常製造操作條件之比例縮小模型中激發層析樹脂。所有1 cm I.D.管柱符合管柱不對稱因數之可接受範圍(0.5-2.0)。各比例縮小管柱之允許床高度範圍與製造管柱相同。表3中概述操作條件。

表3.純化程序之操作條件

樣品	溶液	抗體 (mg/mL) 目標
低pH值去活化裝載物	經離心之收穫物	1
Fractogel SO ₃ 管柱裝載物	經稀釋收穫物 pH 4.9±0.1 9.0±0.5 mS/cm	0.42
Fractogel SO ₃ 管柱溶離	300 mM NaCl，20 mM檸檬酸酯/檸檬 酸 pH 5±0.1 32±3.0 mS/cm	20
Q-Seph管柱裝載物	50 mM NaCl，7 mM 磷酸鈉， 25 mM三乙醇胺 pH 7.7	8
Q-Seph管柱FTW	50 mM NaCl，7 mM 磷酸鈉， 25 mM三乙醇胺 pH 7.7	6
苯基HP管柱裝載物	1.1 M硫酸銨， 20 mM磷酸鈉 pH 7.0	3
苯基HP管柱溶離	0.3 M硫酸銨， 9 mM磷酸鈉 pH 7.0	17

表 4 過程步驟之目標操作條件

過程步驟	操作參數	病毒清除 比例縮小模型	製造操作條件
低pH值去活化	pH值	pH 3.5+0.1	pH 3.5+0.1
	比例因數	1	BA:160,700
Fractogel™ EMD	管柱裝載物	27 g/L裝載物	527 g/L裝載物
	平衡流動速率	190 cm/hr	190 cm/hr
	裝載流動速率	180 cm/hr	180 cm/hr
	洗滌流動速率	190 cm/hr	190 cm/hr
	溶離流動速率	120 cm/hr	120 cm/hr
	溶離液峰收集	OD 3.0至OD 2.0(A ₂₈₀)偏差	OD 3.0至OD 2.0(A ₂₈₀)偏差
	管柱高度	20 cm	20 cm
	比例因數	1	BA: 6465
Q Sepharose™ FF	管柱裝載物	60 g/L裝載物	60g/L裝載物
	流動速率	150 cm/hr	150 cm/hr
	溶離液峰收集	OD 0.4至OD 0.6(A ₂₈₀)偏差	OD 0.4至OD 0.6(A ₂₈₀)偏差
	管柱高度	30 cm	30 cm
	比例因數	1	BA: 2020
苯基 Sepharose™ HP	管柱裝載物	40 g/L裝載物	540 g/L裝載物
	平衡、裝載及洗 滌流動速率	75 cm/hr	75 cm/hr
	溶離流動速率	38 cm/hr	38 cm/hr
	溶離液峰收集	OD 1.0至OD 4.0(A ₂₈₀)偏差	OD 1.0至OD 4.0(A ₂₈₀)偏差
	管柱高度	15 cm	15 cm
	比例因數	1	2025
奈米過濾 DV50/DV20™	30-35 psi	在17 g/L抗體/1.6 m ² 下，120 L	在17 g/L ABT-325/1.6 m ² 下，100 L
	比例因數	1	BA: 1160

1.2 緩衝液毒性/干擾結果

作為病毒清除研究之一部分，測試樣品及緩衝液以判定對於用於檢定中之病毒細胞株是否存在任何毒性。亦對樣品及緩衝液對於所選病毒感染指示細胞株之能力的影響來評定樣品及緩衝液。當結果與相關陽性對照比較時，未偵測到任何測試緩衝液之病毒感染性之顯著減小。作為此測試之結果，核准純化方法中所使用之緩衝液以使病毒製劑在超離心之後再懸浮，以用於層析及奈米過濾步驟之激發測試中。

1.3 病毒清除研究結果

藉由根據以下方程式計算對數降低因數(LRF)來測定各過程步驟在降低病毒力價中之有效性：

$$LRF = \log_{10} \left[\frac{\text{所裝載之病毒量}}{\text{產物流中之病毒量}} \right]$$

表5中概述且提供病毒對數降低數據。以下限形式提供之結果(例如 $LRF \geq 4.54$)指示病毒以低於定量限度之含量存在。

表5.病毒對數降低因數

過程步驟	X-MLV 運作A	X-MLV 運作B	MMV 運作A	MMV 運作B
低pH值	$\geq 4.54 \pm 0.30$	$\geq 5.07 \pm 0.32$	ND*	ND*
Fractogel™ EMD SO3	5.78 ± 0.32	5.22 ± 0.36	1.39 ± 0.48	1.33 ± 0.42
Q Sepharose™	$\geq 5.51 \pm 0.30$	$\geq 5.59 \pm 0.31$	$\geq 7.04 \pm 0.33$	$\geq 7.04 \pm 0.42$
苯基Sepharose™ HP	2.45 ± 0.45	2.03 ± 0.41	0.49 ± 0.47	0.96 ± 0.45
Ultipor DV50™	$\geq 4.95 \pm 0.24$	$\geq 4.61 \pm 0.30$	ND*	ND*
Ultipor DV20™	ND*	ND*	2.92 ± 0.43	4.88 ± 0.32

* 未完成

因為已知MMV對低pH值去活化具有高度抗性，所以僅對於X-MLV執行低pH值去活化步驟。在零時間點達成高水準之降低。在15分鐘時間點，未觀察到病毒感染性。對於60分鐘時間點樣品使用大量接種(bulk inoculation)以增加檢定敏感性且對於一式兩份運作產生 $\geq 4.54 \log_{10}$ 及 $\geq 5.07 \log_{10}$ 之降低因數。儘管澄清收穫物含有約0.5%來自離心澄清過程之殘餘細胞及高濃度之來自培養基組份之蛋白質，X-MLV的病毒去活化速率仍較快。

對於在Fractogel™ SO_3^- 平衡緩衝液中經X-MLV或MMV加料之Fractogel™ SO_3^- 裝載物質執行Fractogel™ SO_3^- 層析步驟。在來自Fractogel™管柱之溶離份中觀察到所測試之兩種病毒之感染性病毒。一式兩份運作所觀察到之X-MLV之降低因數為 $5.78 \log_{10}$ 及 $5.22 \log_{10}$ 。MMV之降低因數為 $\geq 1.39 \log_{10}$ 及 $\geq 1.33 \log_{10}$ 。

對於在Q-Sepharose™平衡緩衝液中經X-MLV或MMV加料之Q-裝載物質執行Q-Sepharose™層析步驟。在來自Q-Sepharose™管柱之流通溶離液樣品中未觀察到所測試之任一病毒之感染性病毒，且在兩種情況中均達到檢定之最小限度。一式兩份運作所觀察到之X-MLV之降低因數為 $\geq 5.51 \log_{10}$ 及 $\geq 5.59 \log_{10}$ ；兩個運作中之MMV之降低因數皆為 $7.04 \log_{10}$ 。

對於在苯基Sepharose™ HP平衡緩衝液中經X-MLV或MMV加料之苯基裝載物質執行苯基Sepharose™ HP層析步驟。在來自苯基Sepharose™ HP管柱之溶離份中觀察到所

測試之兩種病毒之感染性病毒。一式兩份運作所觀察到之 X-MLV 之降低因數為 $2.45 \log_{10}$ 及 $2.03 \log_{10}$ 。此過程步驟對於 MMV 之強健性較低，降低因數為 $0.49 \log_{10}$ 及 $0.96 \log_{10}$ 。

將 Pall DV50™ 奈米過濾器用於使用 X-MLV 進行之病毒激發實驗。Pall DV20™ 過濾器用於使用 MMV 進行之過濾實驗。將兩種病毒再懸浮於苯基 Sepharose™ HP 溶離緩衝液中，然後添加至苯基 Sepharose™ HP 溶離液物質中。選擇 DV20™ 過濾器來執行 MMV 清除。使用 DV50 過濾器，未觀察到濾液樣品中之 X-MLV 之感染性病毒。一式兩份運作所觀察到之 X-MLV 之降低因數為 $\geq 4.95 \log_{10}$ 及 $\geq 4.61 \log_{10}$ 。使用 DV20 過濾器，觀察到濾液樣品中之 MMV 之感染性病毒。一式兩份運作所觀察到之 MMV 之降低因數為 $\geq 2.98 \log_{10}$ 及 $\geq 4.88 \log_{10}$ 。兩個 DV20 運作之間之結果不一致不能由各過濾器之操作條件或病毒加料力價之差異來解釋，因為此等參數符合預定規格。然而，不一致性可歸結於過濾器裝置在操作之前組裝。膜濾器經預濕潤且經高壓釜處理；同時過濾器外殼獨立地經蒸汽滅菌。在即將操作之前將過濾器外殼拆開且將膜置放於外殼中且重新組裝。在重新組裝之前，配有 O 型環之末端部件之緊固可能會導致置放於過濾器外殼中之膜的效能欠佳。

病毒去活化/清除數據(表 6)顯示藉由使用 DV50 奈米過濾膜，抗體純化方法能夠移除最少 $21.91 \log_{10}$ 單位之 X-MLV。除去 DV50 膜，MMV 之總降低因數為最少 8.37

$\log_{10}$ 。若將DV20膜實施於抗體純化方法中，則MMV之總降低因數增加至最少11.29 $\log_{10}$ 。此等數據證明純化方法確保抗體藥物(例如抗IL-18抗體)之病毒安全性。

表6.總病毒清除LRF

過程步驟	X-MLV	MMV
pH值去活化	4.54±0.30	ND*
Fractogel™管柱	5.22±0.36	1.33±0.42
Q Sepharose™管柱	5.51±0.30	7.04±0.42
苯基瓊脂糖HP™管柱	2.03±0.41	0.49**±0.47
Ultipor DV50™	4.6±0.30	ND*
Ultipor DV20™	ND*	2.92±0.43
總計	21.91±0.75	11.29±0.73 8.37***±0.59

*ND=未完成；**不包括在總LRF中；***在DV20™之前經苯基 Sepharose™ HP層析清除

將包含抗IL-18抗體之細胞培養收穫物藉由離心(3000×g)及0.2 μm 過濾來澄清。使用1 M檸檬酸調整澄清收穫物且將其保持在室溫下。藉由離心(16,000×g)將沈澱蛋白質與可溶性蛋白質分離。在SDS存在下、在60℃下將可溶性及不可溶性蛋白質之樣品熱處理30分鐘且藉由聚丙烯醯胺凝膠電泳分析。

根據電泳凝膠(圖5)，很明顯在使亦含有宿主細胞相關蛋白質及培養基組份之澄清培養基的pH值降低後，抗體分子保持於溶解狀態下。在較低pH值下，宿主細胞蛋白質有差別地沈澱且可藉由離心來移除。在pH 4至pH 3.5範圍

中，可見最大程度之沈澱。

測定裝載物pH值對於抗IL-18抗體藉由陽離子交換(CEX)層析結合之能力的影響。(參見表7。)藉由添加檸檬酸來調整細胞培養收穫物之pH值。在保持在室溫下1小時之後，使收穫物離心且經歷0.2 μ m過濾。隨後用水將電導率調整至10 mS。將測試樣品裝載至0.5×5 cm CEX管柱上。在以200 cm/h之線速度裝載之過程中，測定動態結合能力。定量分析蛋白質A HPLC檢定用於量測管柱流通樣品中之抗體力價以測定裝載過程中之5%析出。

表7. pH值對於結合能力之影響

裝載物pH值	裝載物電導率 (mS/cm)	結合?	動態結合能力 (g抗體/L樹脂)
7	10	否	0
7	5	否	0
6	10	否	0
5.5	10	弱	7.5
5	10	是	38

抗IL-18抗體之等電點(pI)為8.43。在比pI低1個pH值單位下之溶液中，抗體分子應帶正電荷且在低電導率下與帶負電荷之陽離子交換樹脂結合。然而，如以上表1中所示，在與pI 8.43相比低超過1個pH值單位的中性pH 7.0下，抗體根本不結合，但當pH值降低時，捕獲樹脂之結合能力增強。因為出現沈澱事件，所以收穫物之pH值滴定具有其他後果。然而，此為有利的，此歸因於存在宿主細胞

相關蛋白質及核酸之選擇性沈澱。

細胞生存率。在生產階段結束時、在高生存率下，將等分試樣之細胞培養物自2公升生物反應器移除。首先將收穫培養物用3 M檸檬酸酸化至pH 5.0，然後酸化至pH 3.5且在周圍溫度下保持1小時。在一小時保持時段之後，用3 M NaOH將培養物調整至pH 4.8。移除樣品且量測經過處理之培養物之細胞計數及生存率。結果參見表8。

表8.酸化對於細胞生存率之影響

樣品處理	細胞密度(細胞/毫升)			生存率
	活細胞	非活細胞	總細胞	
對照	5.06E+06	4.00E+05	5.46E+06	92.8%
pH 5.0	4.68E+06	4.50E+05	5.13E+06	91.2%
pH 3.5保持1小時-滴定至pH 5.0	3.56E+06	1.21 E+06	4.77E+06	74.6%
pH 3.5保持1小時-滴定至pH 5.0 在4°C下保持隔夜	3.09E+06	1.18E+06	4.27E+06	72.4%

細胞培養物暴露於pH 3.5歷時1小時之後，生存率適度下降19.6%(92.8%相較於74.6%)。總細胞密度減少12.4% (5.46×10^6 相較於 4.77×10^6)。

酸化培養物在pH 5及溫度4°C下保持隔夜，導致生存率(3%-74.6%相較於72.4%)及細胞密度(10.5% - 4.77×10^6 相較於 4.27×10^6)較小增量減少。由於宿主細胞蛋白質及核酸沈澱所引起的混濁度增加，因此精確量測細胞密度及生存率較困難。然而，基於宏觀觀察，不存在細胞之任何大規模溶解的跡象。

抗體回收。在醱酵過程結束時，自生產生物反應器獲得細胞培養物。藉由在7000×g下離心自一個等分試樣移除細胞。使用3 M檸檬酸酸化樣品且將其在周圍溫度下保持1小時之時間。在保持1小時之後，用3 M NaOH將培養物調整至pH 4.9。藉由在11,000×g下離心及0.2 μm過濾來澄清酸化樣品。定量分析蛋白質A HPLC檢定用於量測抗體力價。將酸化/澄清後力價與對照之開始力價相比較以測定回收百分率。在中和至pH 5之後且再在4°C下保持隔夜之後檢定樣品。

表9.低pH值酸化/澄清對於抗體回收率之影響

樣品ID	酸化pH值	最終pH值	酸化後 保持時間	力價 (g/L)	酸/ 鹼稀釋 因數	稀釋 校正力價 (g/L)	相對於 對照之力價 (%)
無細胞培養物 (對照)	NA*	NA*	隔夜	0.900	NA*	NA.*	NA.*
樣品1	3.5	4.9	隔夜	0.792	1.064	0.843	93.60/6
樣品2	3.7	4.9	隔夜	0.824	1.049	0.864	96.00/6
樣品3	3.9	4.9	隔夜	0.858	1.036	0.889	98.80/6
原始培養物 (對照)	NA*	NA*	隔夜	0.741	1.000	0.741	100.00/6
樣品1	3.5	4.9	1 h	0.670	1.070	0.717	96.70/6
樣品2	3.5	4.9	隔夜	0.657	1.070	0.703	94.90/6
樣品3	3.7	4.9	1 h	0.709	1.050	0.744	100.50/6
樣品4	3.7	4.9	隔夜	0.706	1.050	0.741	100.00/6
樣品5	3.8	4.9	1h	0.732	1.042	0.763	102.90/6
樣品6	3.8	4.9	隔夜	0.710	1.042	0.740	99.80/6

*NA-不適用

如自表9中之數據可見，在抗體收穫物酸化/澄清之後恢復抗體力價之最佳pH值在3.7至3.9之pH值範圍中。在pH 3.5下，觀察到抗體力價之較小降低(5.1至6.4%)。在經酸化之具有或不具有細胞之培養物中觀察到力價之此較小損耗。基於特定抗體分子之生物化學及物理性質，最佳pH值為不同的。

抗體功能。使用pH 3.5下之3 M檸檬酸酸化生物反應器培養物且將其周圍溫度下保持1小時。隨後用3 M NaOH將酸化收穫物滴定至pH 5且將其藉由離心及0.2 μm 過濾來澄清。藉由陽離子交換層析來進一步純化來自酸化/澄清收穫物之抗體。藉由離心及0.2 μm 過濾來澄清未酸化之生物反應器培養物且藉由蛋白質A親和性層析純化抗體。測定自酸化及未酸化之收穫物純化之抗體對於標靶抗原的結合動力學。參見表10。

表10.低pH值酸化/澄清對於抗體功能之影響

樣品ID	締合速率($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	解離速率(s^{-1})	Kd(M)
藉由陽離子交換層析自酸化收穫物純化之抗體	4.10×10^{-5}	8.04×10^{-5}	1.96×10^{-10}
藉由蛋白質A層析自未酸化之收穫物純化之抗體	3.31×10^{-5}	6.94×10^{-5}	2.10×10^{-10}

數據表明對於抗體而言，生物反應器之酸化對純化之後的抗體功能性幾乎沒有影響。

酸類型對於抗體回收率之影響。在醱酵過程結束時，自生產生物反應器獲得細胞培養物。使用3 M檸檬酸、3 M磷

酸或3 M鹽酸將樣品緩慢酸化且在周圍溫度下保持1小時。在保持1小時之後，用3 M NaOH將培養物調整至pH 5.0。藉由在11,000×g下離心及0.2 μm過濾來澄清酸化樣品。定量分析蛋白質A HPLC檢定用於量測抗體力價。將酸化/澄清後之力價與對照之開始力價相比較以測定回收百分率。參見表11。

表11.酸類型對於低pH值酸化/澄清之後的抗體回收率之影響

樣品ID	用於酸化之酸	酸化pH值	最終pH值	力價(g/L)	酸/鹼稀釋因數	稀釋校正力價(g/L)	相對於對照之力價(%)
收穫物對照	無	NA"	NA"	3.421	NA"	NA"	NA"
收穫物樣品1	3 M檸檬酸	3.8	5.0	3.240	1.071	3.471	101.5%
收穫物樣品2	3 M檸檬酸	3.5	5.0	3.006	1.114	3.349	97.9%
收穫物樣品3	3 M磷酸	3.8	5.0	3.279	1.047	3.431	100.3%
收穫物樣品4	3 M磷酸	3.5	5.0	3.198	1.059	3.385	99.0%
收穫物樣品5	3 M HCl	3.8	5.0	3.131	1.041	3.260	95.3%
收穫物樣品6	3 M HCl	3.5	5.0	2.982	1.059	3.157	92.3%

NA"-不適用

如自表11中之數據可見，當使用檸檬酸或磷酸進行抗體收穫物之低pH值酸化/澄清時，抗體力價恢復為最佳的。如在使用3 M檸檬酸之前所觀察到，將培養物調整至稍微較高pH值導致更好抗體回收率。在pH 3.5下，觀察到抗體力價之較小降低(對於3 M檸檬酸而言為2.1%，對於3 M磷酸而言為1%且對於3 M鹽酸而言為7.7%)。

2. 測定抗IL-12抗體組合物中之宿主細胞蛋白質濃度

此程序描述測定抗IL-12抗體樣品中之殘餘宿主細胞蛋白質濃度之測試方法。酶聯免疫吸附檢定(ELISA)用於將宿主細胞蛋白質(抗原)夾於兩層特異性抗體之間。此後以酪蛋白阻斷非特異性部位。隨後培育宿主細胞蛋白質，在此期間由第一抗體(塗布抗體)捕獲抗原分子。隨後添加第二抗體(生物素標記之抗宿主細胞蛋白質)，其固定至抗原(宿主細胞蛋白質)。添加經HRP結合之中性鏈親和素，其結合至生物素標記之抗宿主細胞蛋白質。此後添加K藍受質。由結合酶所結合之抗體來使色原性受質水解，產生藍色。以2 M H_3PO_4 終止反應，顏色變為黃色。顏色強度與孔中結合之抗原量成正比。

製備50 mM碳酸氫鈉(塗布緩衝液)(pH 9.4)。向1 L燒杯中添加：900 mL Milli-Q水；4.20 g $\pm$ 0.01 g碳酸氫鈉。攪拌直至完全溶解。以1 N NaOH將pH值調整至9.4。轉移至1 L量瓶且以Milli-Q水定容。藉由翻轉混合直至均質。經0.22 μm 無菌過濾單元過濾。自製備之日起在標稱4°C下儲存至多7天。

製備0.104 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.37 M NaCl、0.027 M KCl、0.0176 M KH_2PO_4 (pH值=6.8-6.9)(10×PBS)。將約400 mL Milli-Q水添加至玻璃燒杯中。添加13.94 g $\pm$ 0.01 g之 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。添加40.0 g $\pm$ 0.1 g之NaCl。添加1.00 g $\pm$ 0.01 g之KCl。添加1.20 g $\pm$ 0.01 g之 KH_2PO_4 。攪拌直至均質。轉移至500 mL量瓶中。添加適量Milli-Q水至500 mL體積。藉由翻轉混合。經0.2 μm 無菌過濾單元過濾。在

室溫下儲存至多7天。

製備 1×PBS+0.1%曲拉通 X-100(pH 7.40)：(板洗滌緩衝液)。在 4 L量筒中，將 400 mL 10×PBS(步驟 5.2)與 3500 mL Milli-Q 水混合。檢查 pH 值，且若必要以 1 N HCl 或 1 N NaOH 調整至 7.40 ± 0.05 。以 Milli-Q 水定容。用封口膜(parafilm)將量筒緊密封口且藉由翻轉混合直至均質。轉移至 4 L 瓶中。移除 4 mL 1×PBS 且丟棄。將 4 mL 曲拉通 X-100 添加至 3996 mL 1×PBS 中。置於攪拌板(stir plate)上且攪拌至完全溶解。經由 0.22 μm 無菌過濾單元過濾為製備稀釋緩衝液所需要之量的板洗滌緩衝液。在室溫下儲存至多 7 天。

製備塗布抗體混合物：親和性純化之山羊抗 CHO 599/626/748(在 1.534 mg/mL 下，批號 G11201)：注意：儲備物在標稱 -80°C 下儲存於小瓶中。製備等分試樣。每板在使用時取出一個等分試樣。在即將使用之前如下稀釋抗體混合物以在冷 50 mM 碳酸氫鈉中具有 4 $\mu\text{g/mL}$ 之最終濃度。舉例而言：將 31 μL 塗布抗體混合物添加至 11969 μL 冷塗布緩衝液中。藉由翻轉輕微混合。

製備生物素標記之山羊抗宿主細胞蛋白質混合物(在 0.822 mg/mL 下，批號 G11202)：注意：儲備物在標稱 -80°C 下儲存於小瓶中。製備等分試樣。每板在使用時取出一個等分試樣。在即將使用之前如下將生物素標記之抗體混合物稀釋以在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白中具有 1 $\mu\text{g/mL}$ 之最終濃度。舉例而言：將 14.6 μL 生物素標記之抗體混合物添加至

11985 μL $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白中。藉由翻轉輕微混合。

製備中性鏈親和素-HRP。如下將新批料(2毫克/小瓶)再組至 1 mg/mL：將 400 μL Milli-Q水添加至小瓶中，隨後添加 1600 μL 1×PBS，獲得總共 2 mL。輕微渦旋以混合。在標稱 -20°C 下儲存。製備具有所需體積之等分試樣以使得每板使用 1 個等分試樣。在聚丙烯管中製備。鑑定新批料以測定工作濃度。指定自製備之日起 6 個月到期。舉例而言，若工作濃度經測定為 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ，則如下製備。在即將使用之前在室溫下解凍中性鏈親和素-HRP 之等分試樣。以 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白將 1 mg/mL 中性鏈親和素溶液稀釋至 0.1 mg/mL (100 $\mu\text{g/mL}$)。舉例而言：稀釋 $\times 10$ ，添加 50 μL 中性鏈親和素至 450 μL 酪蛋白中。輕微渦旋以混合。再以 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白將 100 $\mu\text{g/mL}$ 溶液稀釋至 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。舉例而言：稀釋 $\times 500$ ，添加 24 μL 中性鏈親和素 (100 $\mu\text{g/mL}$) 至 11976 μL 酪蛋白中。輕微渦旋以混合。

製備 5.7 2 M 磷酸(終止溶液)。如下自濃磷酸製備 2 M 磷酸溶液。自標籤上所陳述之磷酸%、密度(1.685 g/mL)及式量(98 公克/莫耳)，計算製備 500 mL 2 M 磷酸所需之濃磷酸體積。將以上計算體積之濃磷酸添加至燒瓶中。以 Milli-Q 水定容且藉由翻轉混合直至均質。自製備之日起在周圍溫度下儲存至多 6 個月。

製備稀釋緩衝液(在 1×PBS+0.1% 曲拉通 X100 中稀釋 $\times 100$ 之酪蛋白，pH 7.4)。在 0.22 μm 無菌過濾 1×PBS+0.1% 曲拉通 X100 (pH 7.4) (來自前述) 中將 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白稀釋

×100。舉例而言：添加1 mL 37°C ±2°C 酪蛋白至99 mL 0.22 μm無菌過濾之1×PBS+0.1%曲拉通X100(pH 7.4)中。充分混合。每次使用時新鮮製備。

製備標準物。宿主細胞蛋白質標準物(抗原標準物)(在1.218 mg/mL下，批號G11203)：注意：儲備物在標稱-80°C下以70 μL等分試樣儲存。在室溫下將等分試樣解凍。使用稀釋緩衝液在聚丙烯管中進行連續稀釋。

樣品製備。在聚丙烯管中，將最終本體樣品在稀釋緩衝液中稀釋至24 mg/mL。記錄濃度。注意：使用以下溶液以製備經加料樣品且製備以下提及之12 mg/mL溶液。在聚丙烯微管中，再將24 mg/mL溶液在稀釋緩衝液中稀釋至12 mg/mL。將12 mg/mL溶液各自一式三份裝載板上之孔，共裝載6個孔。

製備加料。在聚丙烯微管中，自20 ng/mL如上述製備之標準物藉由以稀釋緩衝液稀釋2×來製備10 ng/mL宿主細胞蛋白質加料。將10 ng/mL加料溶液裝載板上之三個孔。將20 ng/mL來自步驟6.1之標準溶液用於將樣品加料。

製備經加料樣品。在聚丙烯微管中，將300 μL各為24 mg/mL之最終本體溶液用300 μL之20 ng/mL加料溶液(6.1)加料。將各經加料樣品溶液一式三份裝載孔，共裝載6個孔。

製備對照組。在用於例行測試中之前，必須設定每一新對照組儲備溶液之對照組範圍。對照組儲備物：製備150 μL等分試樣之ABT-874藥物濃縮物批料且在標稱-80°C下冷

凍儲存至多三年。

製備工作對照組。在室溫下將等分試樣之對照組解凍。在聚丙烯管中，將對照組用稀釋緩衝液稀釋至24 mg/mL。在聚丙烯微管中，再將24 mg/mL對照組溶液用稀釋緩衝液稀釋至12 mg/mL。製備單稀釋液且將對照組裝載至板之3個孔中。

ELISA 程序。用板洗滌緩衝液(參看步驟5.3，1×PBS+0.1%曲拉通X-100)填充板洗滌瓶。預處理板墊圈。檢查以下參數：參數應設定為：板類型：對於各循環為1型(總共5個循環)：體積：400 μ L；浸泡時間：10秒；吸液時間：4秒。

檢定程序。用100微升/孔在冷50 mM碳酸氫鈉中為4 μ g/mL之山羊塗布抗體混合物塗布板。輕敲板側直至塗布溶液均勻地覆蓋孔底，以密封帶覆蓋且在標稱4°C下培育，同時在板震盪器(或等效物)上以速度3震盪18小時 $\pm$ 1小時。培育隔夜之後，自冰箱移出板且使其平衡至室溫。震落塗層。在紙巾上吸乾板。以300微升/孔之37°C $\pm$ 2°C酪蛋白阻斷，以密封帶覆蓋且在37°C $\pm$ 2°C下培育，同時在Lab-line Environ板震盪器(或等效物)上以80 rpm $\pm$ 5 rpm震盪1小時。在阻斷培育過程中製備標準物、樣品、對照組、加料及經加料樣品。以洗滌緩衝液洗滌板5次。在紙巾上吸乾板。使用8爪吸液管(8-channel pipette)，將100微升/孔之標準物、樣品、加料、經加料樣品及對照組一式三份吸移至板孔中。將100微升/孔之稀釋緩衝液吸移至板

之所有空孔中以充當空白。以密封帶覆蓋且在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 $80 \text{ rpm} \pm 5 \text{ rpm}$ 震盪 1 小時。填滿模板以在裝載板時用作指導。

板讀取器設定。設定模板，輸入標準物之濃度。不輸入樣品、對照組、加料或經加料樣品之稀釋因數。指定含有稀釋劑之孔作為空白以自所有孔中減去。以洗滌緩衝液洗滌板 5 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之生物素標記之山羊抗體。以密封帶覆蓋且在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 $80 \text{ rpm} \pm 5 \text{ rpm}$ 震盪 1 小時。以洗滌緩衝液洗滌板 5 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之中性鏈親和素-HRP 結合物溶液。以密封帶覆蓋且在 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 $80 \text{ rpm} \pm 5 \text{ rpm}$ 震盪 1 小時。以洗滌緩衝液洗滌板 5 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之冷 K-藍受質，以密封帶覆蓋且在室溫下培育 10 分鐘(一旦將受質添加至第一列，即啟動計時器)，同時在 Lab-line 滴度板震盪器(或等效物)上以速度 3 震盪。藉由添加 100 微升/孔 2 M 磷酸(步驟 5.7)來終止反應。將板以速度 3 置於板震盪器上歷時 3-5 分鐘。在 450 nm 下讀取板。

數據分析及計算。注意：僅光學密度落在標準曲線之實際定量界限(2.5 ng/mL 標準物)內且符合以下陳述之 CV% 或差異%標準的樣品、加料、經加料樣品及對照組為可接受的。若樣品 OD 低於 2.5 ng/mL 標準物，則結果應報導為少

於 2.5 ng/mL。隨後，此值應除以稀釋樣品濃度(12 mg/mL)從而報導以 ng/mg 為單位之值。若樣品之宿主細胞濃度較高，導致未經加料及/或經加料樣品高於標準曲線，則將值報導為 >100 ng/mL。隨後，此值應除以稀釋樣品濃度(12 mg/mL)從而報導以 ng/mg 為單位之值。當樣品低於 2.5 ng/mL 標準物時，樣品之加料回收率計算值視為零。

標準曲線。應將標準濃度輸入方案模板中。使用二次曲線擬合。決定係數必須為 ≥ 0.99 且一式三份孔之間的 CV% 必須為 $\leq 20\%$ 。若不符合此標準，則丟棄一個標準物(1個等級，3個孔)。若丟棄 1.25 ng/mL，則僅光學密度落在 2.5 ng/mL 及 100 ng/mL(其餘標準曲線點)光學密度範圍內之樣品及經加料樣品為可接受的。另外，對於各標準級之一式三份而言，若單孔明顯地受到污染或顯示弱結合，則其可丟棄。若自標準級中丟棄一個孔，則其餘重複(replicate)之差異%必須 $\leq 20\%$ 。OD 值顯示接近於板本底(空白)之最低標準物之 CV% 應為 $\leq 30\%$ 。若丟棄一個孔，則其餘重複之差異%必須 $\leq 35\%$ 。若丟棄最低標準物，則僅光學密度落在其餘標準曲線等級光學密度範圍內之樣品及經加料樣品為可接受的。

樣品。一式三份孔之間的 CV% 應為 $\leq 20\%$ 。報導一式三份孔之間的 CV%。可丟棄來自各樣品稀釋液之一個孔。其餘重複必須具有 $\leq 20\%$ 之差異%。注意：若未經加料樣品 OD 低於 2.5 ng/mL 標準物 OD，則差異%標準不適用於未經加料結果。參看以上計算。

如下自平均值(ng/mL)計算以 ng/mg 為單位之實際宿主細胞濃度： CHO 宿主細胞蛋白質(ng/mg)=平均「未經加料樣品結果(ng/mL)」_稀釋樣品濃度(12 mg/mL)。

加料。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄CV%。可丟棄來自該加料之一個孔。其餘點必須具有=20%之差異%。參看以上計算。以 ng/mL 為單位報導宿主細胞濃度。此結果用於計算加料回收率。加料之所得濃度(ng/mL)必須為理論加料濃度 $\pm 20\%$ 。記錄結果且指示合格或不合格。若加料結果不在理論值之20%內，則必須重複檢定。平均加料濃度(ng/mL) $\times 100$ =必須為 $100\% \pm 20\%$ 10 ng/mL 。

經加料樣品。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄一式三份孔之間的CV%。可丟棄來自各經加料樣品稀釋液之一個孔。其餘重複必須具有=20%之差異%。參看以上計算。以 ng/mL 為單位報導各稀釋液之「經加料樣品結果」。記錄一式兩份稀釋液之間的差異%。稀釋液之間的差異%應為=25%。此等結果用於計算加料回收率。

使用下式計算各稀釋組之加料回收率%： $\text{加料回收率}\% = \frac{\text{經加料樣品值} - \text{未經加料樣品值}}{\text{加料值}} \times 100$ 。注意：(1)若未經加料樣品值OD低於 2.5 ng/mL 標準物，則加料回收率%計算值視為零。對於各樣品而言，各稀釋液之加料回收率%必須為 $100\% \pm 50\%$ (50% - 150%)。記錄結果及合格/不合格。

對照組。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄CV%

結果。可丟棄來自該對照組之一個孔。其餘重複必須具有 $\geq 20\%$ 之差異%。參看以上計算。以ng/mL為單位報導對照組中之宿主細胞濃度。如下以ng/mg為單位計算宿主細胞濃度：宿主細胞蛋白質(ng/mg)=以ng/mL為單位之對照組宿主細胞蛋白質結果。

3. 測定抗IL-12抗體組合物中之蛋白質A濃度

在此ELISA中，將板以雞抗蛋白質A塗布且培育。非特异性部位以PBS中之酪蛋白阻斷。在 $1\times\text{PBS}+0.1\%$ 曲拉通X-100中洗滌板以移除未結合之物質。在 $1\times\text{PBS}+4.1\%$ 曲拉通X+10%酪蛋白中稀釋樣品及Cys-r蛋白質A標準物。藉由在 $95^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下加熱使溶液變性，將蛋白質A與ABT-874分離。隨後將溶液添加至板且培育。用 $1\times\text{PBS}+0.1\%$ 曲拉通X-100將未結合之物質洗去。將生物素標記之雞抗蛋白質A添加至微量滴定板且培育。洗滌板以移除未結合之物質且添加中性鏈親和素-過氧化酶結合物。

中性鏈親和素結合至已與孔結合之生物素標記之雞抗蛋白質A。再次洗滌板以移除未結合之中性鏈親和素且將K-藍(四甲基聯苯胺(TMB))受質添加至板。由結合之中性鏈親和素使受質水解，產生藍色。以磷酸終止反應，顏色變為黃色。孔中之黃色強度與存在於孔中之蛋白質A濃度成正比。

製備試劑及溶液酪蛋白瓶必須升溫至 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；超音波處理2分鐘，且等分試樣。等分試樣儲存於標稱 4°C 下。當運作檢定時，所需數目之酪蛋白等分試樣應置於 $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$

下。在冷卻狀態下使用塗布緩衝液及受質(恰在使用之前自標稱4°C獲取)。

50 mM碳酸氫鈉(塗布緩衝液)(pH 9.4)。向1 L燒杯中添加：900 mL Milli-Q水4.20 g $\pm$ 0.01 g碳酸氫鈉。攪拌直至完全溶解。以1 N NaOH將pH值調整至9.4。轉移至1 L量瓶且以Milli-Q水定容。藉由翻轉混合直至均質。經0.22 CA μ m無菌過濾單元過濾。自製備之日起在標稱4°C下儲存至多7天。

104 M Na₂HPO₄*7H₂O、1.37 M NaCl、0.027 M KCl、0.0176 M KH₂PO₄(pH值=6.8-6.9)。(10×PBS)：將約400 mL Milli-Q水添加至玻璃燒杯中。添加13.94 g $\pm$ 0.01 g之Na₂HPO₄*7H₂O。添加40.0 g $\pm$ 0.1 g之NaCl。添加1.00 g $\pm$ 0.01 g之KCl。添加1.20 g $\pm$ 0.01 g之KH₂PO₄。攪拌直至均質。轉移至500 mL量瓶中。添加適量Milli-Q水至500 mL體積。藉由翻轉混合。經0.2 CA μ m無菌過濾單元過濾。在室溫下儲存至多7天。

1×PBS+0.1%曲拉通X-100(pH 7.40)：(板洗滌緩衝液)。在4 L量筒中，將400 mL 10×PBS(參見上面)與3500 mL Milli-Q水混合。檢查pH值，且若必要以1 N HCl或1 N NaOH調整至7.40 $\pm$ 0.05。以Milli-Q水定容。用封口膜將量筒緊密封口且藉由翻轉混合直至均質。轉移至4 L瓶中。移除4 mL 1×PBS且丟棄。將4 mL曲拉通X-100添加至3996 mL 1×PBS中。置於攪拌板上且攪拌至完全溶解。在室溫下儲存至多7天。

雞抗蛋白質A塗布抗體。每板在使用時取出一個等分試樣之抗體。為鑑定新批次之雞抗蛋白質A，可能需要一起使用雞抗蛋白質A-生物素結合物(自相同批次之塗料製備)且對其鑑定。在即將使用之前：將冷50 mM碳酸氫鈉中之抗體混合物稀釋至在塗料鑑定過程中測定出之濃度。舉例而言：若在鑑定過程中裝載至板上之塗料濃度經測定為6 $\mu\text{g/mL}$ 且若儲備物濃度為3000 $\mu\text{g/mL}$ ，則將24 μL 塗布抗體添加至11976 μL 冷塗布緩衝液中。藉由翻轉輕微混合。

生物素標記之雞抗蛋白質A。每板在使用時取出一個等分試樣之抗體。為了鑑定新批次之雞抗蛋白質A-生物素結合物，可能需要將其與相同批次之雞抗蛋白質A一起使用且對其鑑定，該雞抗蛋白質A-生物素結合物由該雞抗蛋白質A製備。在即將使用之前：將 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白中之生物素標記抗體稀釋至在生物素標記抗體鑑定過程中測定出之濃度。舉例而言：若在鑑定過程中裝載至板上之生物素標記抗體之濃度經測定為4 $\mu\text{g/mL}$ 且若儲備濃度為1000 $\mu\text{g/mL}$ ，則將48 μL 生物素標記之抗體添加至11952 μL $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白中。藉由翻轉輕微混合。

中性鏈親和素-HRP。如下將新批料(2毫克/小瓶)再組至1 mg/mL：將400 μL Milli-Q水添加至小瓶中，隨後添加1600 μL 1 $\times$ PBS，獲得總共2 mL。輕微渦旋以混合。在標稱 -80°C 下儲存。製備具有所需體積之等分試樣以使得每板使用1個等分試樣。在聚丙烯管中製備。指定自製備之日起6個月的到期日。舉例而言，若工作濃度經測定為0.1

$\mu\text{g/mL}$ ，則如下製備。在即將使用之前在室溫下解凍中性鏈親和素-HRP之等分試樣。用 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白將 1 mg/mL 中性鏈親和素溶液稀釋至 0.01 mg/mL ($10 \mu\text{g/mL}$)。舉例而言：稀釋 $\times 10$ ，將 $50 \mu\text{L}$ 中性鏈親和素添加至 $450 \mu\text{L}$ 酪蛋白中。輕微渦旋以混合，再次稀釋 $\times 10$ ，將 $100 \mu\text{L} \times 10$ 中性鏈親和素添加至 $900 \mu\text{L}$ 酪蛋白中。輕微渦旋以混合。再用 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 酪蛋白將 $10 \mu\text{g/mL}$ 溶液稀釋至 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 。舉例而言：稀釋 $\times 100$ ，將 $120 \mu\text{L}$ 中性鏈親和素 ($10 \mu\text{g/mL}$) 添加至 $11880 \mu\text{L}$ 酪蛋白中。輕微翻轉若干次以混合。

終止溶液(使用購買之 1 N 磷酸。)自收到之日起在周圍溫度下儲存至多 1 年。稀釋緩衝液 ($1 \times \text{PBS} + 4.1\%$ 曲拉通 X100 + 10% 酪蛋白， $\text{pH } 7.4$)。將 $86 \text{ mL } 1 \times \text{PBS} + 0.1\%$ 曲拉通 X100 ($\text{pH } 7.4$) (來自步驟 5.3) 添加至燒杯或燒瓶中，添加 4 mL 之曲拉通 X-100，及 10 mL 阻斷劑酪蛋白之 PBS 溶液，且攪拌以溶解/混合。溶解曲拉通可耗時 20 至 30 分鐘。此等於 $1 \times \text{PBS} + 4.1\%$ 曲拉通 X100 + 10% 酪蛋白 ($\text{pH } 7.4$) 溶液。經 $0.22 \mu\text{m}$ 無菌過濾單元過濾。每次使用時新鮮製備。此對於 1 個板為足夠的。

蛋白質 A 標準物(抗原標準物)。注意：儲備物在標稱 -20°C 下以 $70 \mu\text{L}$ 等分試樣儲存。在冰上將等分試樣解凍。根據下表中之實例進行連續稀釋，使用製造商 COA 上陳述之濃度、使用稀釋緩衝液(參見上面)，以聚丙烯管進行：舉例而言，若 COA 陳述儲備物濃度為 2.1 mg/mL (2100000 ng/mL)，則：在冰上解凍樣品。在聚丙烯微離心

管中，將最終本體樣品在稀釋緩衝液(上述)中稀釋至20 mg/mL。進行2次獨立稀釋。記錄濃度。使用以下溶液以製備經加料樣品且製備10 mg/mL溶液。舉例而言：X mg/mL溶液之濃度(mg/mL)、體積 μL ，稀釋劑之體積(μL)，自120儲備樣品連續稀釋。在聚丙烯微離心管中，再將20 mg/mL溶液在稀釋緩衝液中稀釋至10 mg/mL。

製備加料。在聚丙烯微離心管中，自0.593 ng/mL以上步驟6.1中製備之標準物藉由以稀釋緩衝液稀釋2 $\times$ 來製備0.296 ng/mL蛋白質A加料。進行單稀釋。將0.296 ng/mL加料溶液裝載至板上之一式三份孔。將0.593 ng/mL來自步驟6.1之標準溶液用於將樣品加料。

製備經加料樣品。在聚丙烯微離心管中，將500 μL 之各20 mg/mL最終本體溶液用500 μL 0.593 ng/mL加料溶液加料。保持以便進行變性。將各經加料樣品溶液裝載至板上之一式三份孔，共裝載6個孔。

製備對照組。獲得大量ABT-874藥物。製備150 μL 等分試樣且自等分之日起在標稱-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷凍儲存三年。

工作對照組：在冰上將等分試樣之對照組解凍。在聚丙烯微離心管中，將對照組用稀釋緩衝液稀釋至10 mg/mL以具有1000 μL 之最終體積。製備單稀釋液。保持以便進行變性。將對照組裝載至板上之一式三份孔。

變性。對於板空白而言，將1000 μL 稀釋緩衝液添加至數目等於在板上運作之空白的微離心管中。可將管蓋用膜封口以防止其在加熱過程中彈開或可將第二支架置於其上

以保持蓋封閉。在 $95^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下加熱標準物、未經加料樣品、經加料樣品、加料、空白及對照組15分鐘。在冷卻過程中自管移除封口膜(若使用)。容許冷卻15分鐘，且在約 10000 rpm下離心5分鐘。將 700 μL 上清液轉移至微管中以裝載至板上。當心不要擾動曲拉通/蛋白質離心塊。

板墊圈說明及水浴設定。用板洗滌緩衝液(參看步驟 5.3， $1 \times \text{PBS} + 0.1\% \text{曲拉通 X-100}$)填充板洗滌瓶。預處理板墊圈。檢查以下參數：參數應設定為：板類型：對於各循環為 1 型(總共 4 個循環)：吸液速度：10 mm/s；體積：400 μL ；浸泡時間：5 秒；吸液時間：6 秒。開啟水浴且設定為 95°C 。容許水浴溫度平衡至 $95^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 歷時至少 30 分鐘。

檢定程序：可藉由檢核完成之步驟而將檢核表用作指導。另外，記錄所有在檢定過程中使用之設備。運作檢定每天所使用之適量酪蛋白等分試樣必須置於 $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下。在冷卻狀態下使用塗布緩衝液及受質。在阻斷培育之前及期間製備標準物、樣品、對照組、加料及經加料樣品。可能耗費 1 小時以上來阻斷培育以製備稀釋液，轉移至埃彭多夫(eppendorf)管，變性 15 分鐘，冷卻 15 分鐘，離心 5 分鐘，且轉移至微管中。在阻斷板之前留出至少 40 分鐘。使用 12 爪吸液管將樣品、經加料樣品、標準物、對照組、檢定加料及空白自 B 列至 G 列水平地裝載至板上。裝載較高至較低濃度之標準物。自 2 行至 11 行垂直地進行板塗布、生物素添加、中性鏈親和素添加、受質添加及終止溶液添加。

用冷 50 mM 碳酸氫鈉中之 100 微升/孔塗布抗體塗布板。輕敲板側直至塗布溶液均勻地覆蓋孔底，以密封帶覆蓋且在標稱 4°C 下培育，同時以速度 3 在板震盪器(或等效物)上震盪。

培育隔夜之後，自冰箱移出板且使其平衡至室溫。震落塗層。在紙巾上吸乾板。以 300 微升/孔之 37°C ± 2°C 酪蛋白阻斷，以密封帶覆蓋且在 37°C ± 2°C 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 80 rpm ± 5 rpm 震盪 1 小時 ± 10 分鐘。

在阻斷培育之前及期間製備標準物、樣品、對照組、加料及經加料樣品。以洗滌緩衝液洗滌板 4 次。在紙巾上吸乾板。使用 8 爪吸液管，將 100 微升/孔之變性標準物、樣品、加料、經加料樣品、空白及對照組一式三份吸移至板孔中。不使用板之外部孔，將未經處理之稀釋緩衝液添加至此等孔中。以密封帶覆蓋且在 37°C ± 2°C 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 80 rpm ± 5 rpm 震盪 2 小時。填滿模板以在裝載板時用作指導。

板讀取器設定。以洗滌緩衝液洗滌板 4 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之生物素標記之抗體。以密封帶覆蓋且在 37°C ± 2°C 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 80 rpm ± 5 rpm 震盪 1 小時。

以洗滌緩衝液洗滌板 4 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之中性鏈親和素-HRP 結合溶液。一旦將中性鏈親和素添加至最後一列，啟動計時器。以密封帶覆蓋且在

37°C ± 2°C 下培育，同時在 Lab-line Environ 板震盪器(或等效物)上以 80 rpm ± 5 rpm 震盪 30 分鐘。以洗滌緩衝液洗滌板 4 次。在紙巾上吸乾板。添加 100 微升/孔之冷 K-藍受質，以密封帶覆蓋且在室溫下培育 10 分鐘(一旦將受質添加至第一列，即啟動計時器)，同時在 Lab-line 滴度板震盪器(或等效物)上以速度 3 震盪。藉由添加 100 微升/孔 1 N 磷酸來終止反應。將板以速度 3 置於板震盪器上歷時 3 分鐘。在 450 nm 下讀取板。

數據分析及計算，注意：僅光學密度落在標準曲線之實際定量界限內且符合以下陳述之 CV% 或差異 % 標準的樣品、加料、經加料樣品及對照組為可接受的。若樣品 OD 低於標準曲線，則結果應報導為少於 0.18 ng/mL (檢定 LOQ)。隨後，此值應除以稀釋樣品濃度 (10 mg/mL) 從而報導以 ng/mg 為單位之值。若樣品之蛋白質 A 濃度較高，導致未經加料及/或經加料樣品高於標準曲線 (2 ng/mL)，則再稀釋以處於標準曲線內。隨後，此值應除以稀釋樣品濃度從而報導以 ng/mg 為單位之值。為了計算加料回收率，即使當未經加料樣品值 (ng/mL) 低於曲線時，亦自經加料樣品值 (ng/mL) 減去未經加料樣品值 (ng/mL)。若值為負或獲得「範圍」，則未經加料樣品之加料回收率計算值視為零。

標準曲線。應將標準濃度輸入方案模板中。使用二次曲線擬合。決定係數必須為 ≥ 0.99 且一式三份孔之間的 CV% 必須為 $\leq 20\%$ 。若不符合此標準，則丟棄一個標準物 (1 個等級，3 個孔)。若丟棄 0.18 ng/mL，則僅光學密度落在 0.26

ng/mL及2 ng/mL(其餘標準曲線點)光學密度範圍內之樣品及經加料樣品為可接受的。另外，對於各標準級之一式三份而言，若單孔明顯地受到污染或顯示弱結合，則其可丟棄。若自標準級中丟棄一個孔，則其餘重複必須具有 $\geq 20\%$ 之差異%。OD值顯示接近於板本底(空白)的最低標準物之CV%應為 $\leq 30\%$ 。若丟棄一個孔，則其餘重複之差異%必須為 $\leq 35\%$ 。若丟棄最低標準物，則僅光學密度落在其餘標準曲線等級光學密度範圍內之樣品及經加料樣品為可接受的。

如下計算差異%： $\text{差異}\% = (\text{絕對}(\text{所得稀釋液1}-\text{所得稀釋液2})/\text{平均值}) \times 100\%$ 。若標準物不滿足上述標準，必須重複檢定。報導測定結果之CV%及/或差異%值及標準曲線係數。

樣品。一式三份孔之間的CV%應為 $\leq 20\%$ 。報導一式三份孔之間的CV%。可丟棄來自各樣品稀釋液之一個孔。其餘重複必須具有 $\leq 20\%$ 之差異%。注意：若未經加料樣品OD低於最低標準物OD，則差異%標準不適用於未經加料結果。參看以上計算。

以ng/mL為單位報導各稀釋液之「未經加料樣品結果」。此等值用於計算加料回收率。計算平均「未經加料樣品結果(ng/mL)」及稀釋液之間的差異%。報導結果。稀釋液之間的差異%必須為 $\leq 25\%$ 。如下自平均值(ng/mL)計算以ng/mg為單位之實際蛋白質A濃度： $\text{蛋白質A(ng/mg)} = \text{平均「未經加料樣品結果(ng/mL)」稀釋樣品濃度(10$

mg/mL)。記錄結果。

加料。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄CV%。可丟棄來自該加料之一個孔。其餘點必須具有=20%之差異%。參看以上計算。以ng/mL為單位報導蛋白質A濃度。此結果用於計算加料回收率。加料之所得濃度(ng/mL)必須為理論加料濃度 $\pm 20\%$ 。記錄結果且指示合格或不合格。若加料結果不在理論值之20%內，則必須重複檢定。平均加料濃度(ng/mL) $\times 100$ 必須為 $100\% \pm 20\%$ 0.296 ng/mL。

經加料樣品。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄一式三份孔之間的CV%。可丟棄來自各經加料樣品稀釋液之一個孔。其餘重複必須具有=20%之差異%。參看以上計算。以ng/mL為單位報導各稀釋液之「經加料樣品結果」。記錄一式兩份稀釋液之間的差異%。稀釋液之間的差異%應為=25%。此等結果用於計算加料回收率。使用下式計算各稀釋組之加料回收率%：加料回收率%=經加料樣品值-未經加料樣品值 $\times 100$ 。加料值，注意：為了計算加料回收率，即使當未經加料樣品值(ng/mL)低於曲線時，亦自經加料樣品值(ng/mL)減去未經加料樣品值(ng/mL)。若值為負或獲得「範圍」，則未經加料樣品之加料回收率計算值視為零。對於各樣品而言，各稀釋液之加料回收率%必須為 $100\% \pm 50\%$ (50%-150%)。記錄結果及合格/不合格。

對照組。一式三份孔之間的CV%應為=20%。記錄CV%結果。可丟棄來自該對照組之一個孔。其餘重複必須具有

=20%之差異%。

本文中引用各種公開案，其內容物全部以引用的方式併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1揭示抗IL-12抗體之非限制性實例(ABT-847)之重鏈及輕鏈可變區序列。

圖2揭示抗IL-18抗體之非限制性實例(ABT-325)之重鏈及輕鏈序列。

圖3揭示抗TNF α 抗體之非限制性實例(阿達木單抗(Adalimumab))之重鏈及輕鏈序列。

圖4描述本發明之純化方案之非限制性流程圖。

圖5展示宿主細胞蛋白質按照pH值進行之選擇性沈澱。詳言之，圖5為聚丙烯醯胺電泳凝膠之像片，其指示在降低澄清培養基之pH值後，待純化之抗體分子保持於溶解狀態下。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：98135686

※申請日：98.10.20

※IPC 分類：C07K¹⁶/₀₉(2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

C07K¹⁶/₁₈ (2006.01)

抗體純化過程中之病毒去活化

C07K¹⁶/₃₆ (2006.01)

VIRAL INACTIVATION DURING PURIFICATION OF ANTIBODIES

二、中文發明摘要：

本文中描述自樣品基質分離及純化抗體之方法。本發明之一態樣係關於使抗體純化之各步驟中所產生之樣品之病毒減少/去活化。在特定態樣中，本文中之方法採用酸化步驟，接著一或多個層析步驟。層析步驟可包括一或多個以下層析程序：離子交換層析、親和性層析及疏水相互作用層析。

三、英文發明摘要：

Described herein are methods for isolating and purifying antibodies from a sample matrix. One aspect of the present disclosure is directed to viral reduction/inactivation of samples generated in the various steps of antibody purification. In a particular aspect, methods herein employ an acidification step followed by one or more chromatography steps. The chromatography steps can include one or more of the following chromatographic procedures: ion exchange chromatography, affinity chromatography, and hydrophobic interaction chromatography.

七、申請專利範圍：

1. 一種自包含抗體、宿主細胞蛋白質(HCP)及病毒顆粒之樣品混合物產生HCP減少之抗體製劑的方法，其中與該樣品混合物相比，該製劑包含病毒顆粒數目減少或病毒活性減少，該方法包含：
 - (a)使該樣品基質pH減小，由此形成初級回收樣品，其中該pH減小至約3至約5之pH；
 - (b)將該初級回收樣品調整至約4.5至約6.5之pH，隨後將該初級回收樣品施加至離子交換樹脂及收集離子交換樣品；
 - (c)將該離子交換樣品施加至疏水相互作用層析(HIC)樹脂及收集HIC樣品，其中該HIC樣品包含該HCP減少之抗體製劑。
2. 如請求項1之方法，其中該pH減小係藉由適合酸與該樣品混合物混合達成，其中該適合酸係選自由檸檬酸、磷酸、乙酸、辛酸及其類似酸組成之群。
3. 如請求項1之方法，其中該離子交換樹脂為陰離子交換樹脂或陽離子交換樹脂。
4. 如請求項3之方法，其中該離子交換樹脂為陽離子交換樹脂。
5. 如請求項4之方法，其中該陽離子交換樹脂係選自由以下組成之群：羧甲基(CM)、磺乙基(SE)、磺丙基(SP)、Fractogel SO_3^- 、磷酸根(P)及磺酸根(S)。
6. 如請求項5之方法，其中該陽離子交換樹脂為Fractogel

SO₃⁻。

7. 如請求項3之方法，其中該離子交換樹脂為陰離子交換樹脂。
8. 如請求項7之方法，其中該陰離子交換樹脂係選自由以下組成之群：Q瓊脂糖凝膠(Q sepharose)、二乙胺基乙基(DEAE)、四級胺基乙基(QAE)及四級胺(Q)基團。
9. 如請求項8之方法，其中該陰離子交換樹脂為Q-瓊脂糖凝膠(Q-sepharose)。
10. 如請求項1之方法，其中該離子交換步驟包含第一離子交換步驟及第二離子交換步驟。
11. 如請求項10之方法，其中該第一離子交換步驟為陽離子交換步驟，接著第二陰離子交換步驟。
12. 如請求項10之方法，其進一步包含中間步驟，其中該中間步驟為在該第一離子交換步驟與該第二離子交換步驟之間進行之過濾步驟。
13. 如請求項12之方法，其中該過濾步驟係藉由捕獲超濾/透濾達成。
14. 如請求項1之方法，其中該HIC係使用包含一或多個疏水性基團之管柱達成。
15. 如請求項14之方法，其中該一或多個疏水性基團係選自由以下組成之群：烷基、芳基及其組合。
16. 如請求項14之方法，其中該管柱係選自由以下組成之群：苯基 Sepharose™(諸如苯基 Sepharose™ 6快速流動管柱、苯基 Sepharose™ 高效柱)、辛基 Sepharose™ 高效

柱、Fractogel™ EMD丙基、Fractogel™ EMD苯基管柱、Macro-Prep™ 甲基支撐物、Macro-Prep™ 第三丁基支撐物、WP HI-丙基(C₃)™管柱及Toyopearl™ 乙醚、苯基或丁基管柱。

17. 如請求項16之方法，其中該管柱包含苯基瓊脂糖凝膠。
18. 如請求項1之方法，其進一步包含過濾步驟，其中使該HIC樣品過濾以移除病毒顆粒及促進緩衝液交換。
19. 如請求項1之方法，其中該HCP減少之抗體製劑包含抗IL-12抗體或抗IL-18抗體或其抗原結合部分。
20. 如請求項19之方法，其中該抗IL-18抗體或其抗原結合部分為人類化抗體、嵌合抗體或多價抗體。
21. 如請求項20之方法，其中該抗IL-18抗體或其抗原結合部分為人類化抗體。
22. 如請求項20之方法，其中該抗IL-18抗體或其抗原結合部分為分離之人類抗體，其以約 10^{-6} 至約 10^{-12} M或 10^{-12} M以下範圍內之 K_d 與人類IL-18解離。
23. 如請求項19之方法，其中該抗IL-18抗體或其抗原結合部分在活體內及活體外中和IL-18。
24. 如請求項1之方法，其中該製劑實質上不含HCPs。
25. 一種自包含抗體及至少一種宿主細胞蛋白質(HCP)之樣品混合物產生HCP減少之抗體製劑的方法，該方法包含：
 - (a)使該樣品基質pH減小，由此形成初級回收樣品，其中該pH減小至約3.5；

(b)將該初級回收樣品調整至約5.0之pH，隨後將該初級回收樣品施加至陽離子交換樹脂及收集陽離子交換樣品；

(c)將該陽離子交換樣品施加至陰離子交換樹脂及收集陰離子交換樣品；及

(d)將該陰離子交換樣品施加至疏水相互作用層析(HIC)樹脂及收集HIC樣品，其中該HIC樣品包含該HCP減少之抗體製劑。

26. 一種自包含抗體及至少一種宿主細胞蛋白質(HCP)之樣品混合物產生HCP減少之抗體製劑的方法，該方法包含：

(a)使該樣品基質pH減小，由此形成初級回收樣品，其中該pH減小至約3.5；

(b)將該初級回收樣品調整至約5.0之pH，隨後將該初級回收樣品施加至陽離子交換樹脂及收集陽離子交換樣品；

(c)使該陽離子交換樣品過濾及收集濾液；

(d)將(c)之濾液施加至陰離子交換樹脂及收集陰離子交換樣品；及

(e)將該陰離子交換樣品施加至疏水相互作用層析(HIC)樹脂及收集HIC樣品，其中該HIC樣品包含該HCP減少之抗體製劑。

27. 如請求項26之方法，其進一步包含蛋白質A親和性層析步驟在該初級回收樣品施加至陽離子交換樹脂之前。

28. 一種醫藥組合物，其包含由如請求項1之方法產生之HCP減少之抗體製劑及醫藥學上可接受之載劑。
29. 如請求項28之醫藥組合物，其中該抗體為抗IL-12抗體或抗IL-18抗體或其抗原結合部分。
30. 如請求項28之醫藥組合物，其中該組合物實質上不含HCPs。
31. 如請求項28之醫藥組合物，其用於中和IL-12或IL-18促成之病症。

八、圖式：

- 抗IL-12抗體 (ABT-874) 重鏈可變區序列

1	10	20	30	40
QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS <u>SYGMHWVRQA</u>				
CDR1				
PGKGLEQVAF <u>IRYDGSNKYY</u> ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY				
CDR2				
LQMNSLRAED TAVYYCKTHG <u>SHDNWGQGT</u> M VTVSS				
CDR3				

- 抗IL-12抗體 (ABT-874) 輕鏈可變區序列

1	10	20	30	40
QSVLTQPPSV SGAPGQRVTI <u>SCSGSRSNIG</u> <u>SNTVKWYQQL</u>				
CDR1				
PGTAPKLLIY <u>YGNDQRPSGV</u> PDRFSGSKGT SASLAITGVQ				
CDR2				
AEDEADYYCQ <u>SYDRYTHPAL</u> <u>LFGTGTKVTVLG</u>				
CDR3				

圖 1

• 抗 IL-18 抗體(ABT-325)重鏈序列

1	10	20	30	40	50
EVQLVQSGTE	VKKPGESLKI	SCKGSGYTVT	SYWIGWVRQM	PGKGLEWMGF	
IYPGDSETRY	SPTFQGQVTI	SADKSFNTAF	LQWSSLKASD	TAMYYCARVG	
SGWYPYTFDI	WGQGTMTVS	SASTKGPSVF	PLAPSSKSTS	GGTAALGCLV	
KDYFPEPVTV	SWNSGALTSG	VHTFPAVLQS	SGLYSLSSVV	TVPSSSLGTQ	
TYICNVNHKP	SNTKVDKKVE	PKS			

• 抗 IL-18 抗體(ABT-325)輕鏈序列

1	10	20	30	40	50
EIVMTQSPAT	LSVSPGERAT	LSCRASESIS	SNLAWYQQKP	GQAPRLFITY	
ASTRATDIPA	RFSGSGSGTE	FTLTISLQS	EDFAVYYCQQ	YNNWPSITFG	
QGTRLEIKRT	VAAPSVFIFP	PSDEQLKSGT	ASVCLLNNE	YPREAKVQWK	
VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYLSSTL	TLSKADYEKH	KVYACEVTHQ	
GLSSPVTKSF	NRGE				

圖2

- 抗TNF α 抗體（阿達木單抗）重鏈可變區序列

```

1           10           20           30           40           50
EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSA
                                   CDR1

ITWNSGHIDY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAKVS
      CDR2

YLSTASSLDY WGQGTLVTVS S
      CDR3

```

- 抗TNF α 抗體（阿達木單抗）輕鏈可變區序列

```

1           10           20           30           40           50
DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIR NYLAWYQQKP GKAPKLLIYA
                                   CDR1

ASTLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCQR YNRAPYTFGQ
      CDR2                                   CDR3

GTKVEIK

```

圖3

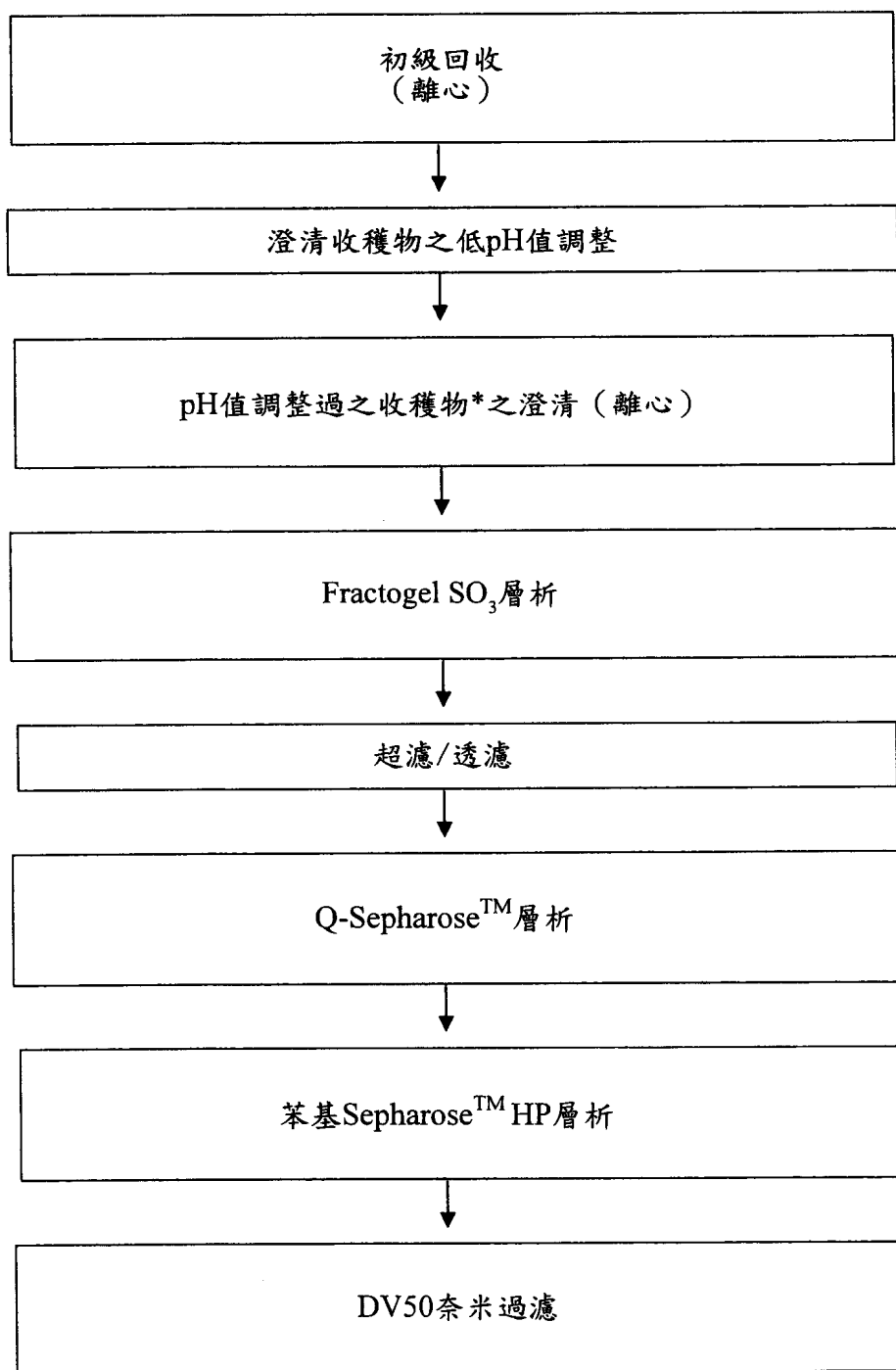


圖4

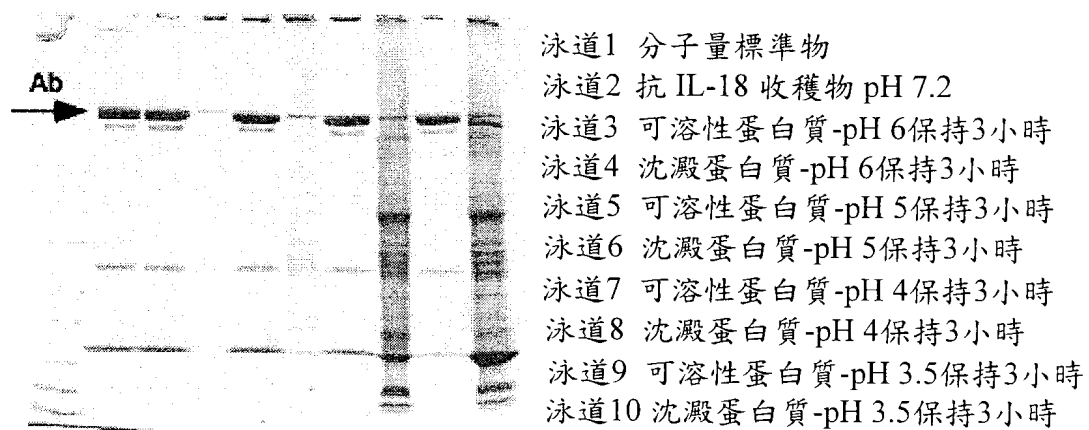


圖5

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (4) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)